



No. 14-171778- -00000-0000

Fecha: 2014-08-06 15:53:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: ANTICUERPOS CD47 Y MÉTODOS DE USO LOS MISMOS

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL C12P 21/08

71. SOLICITANTE: INHIBRX LLC

DOMICILIO: California, Estados Unidos de América.

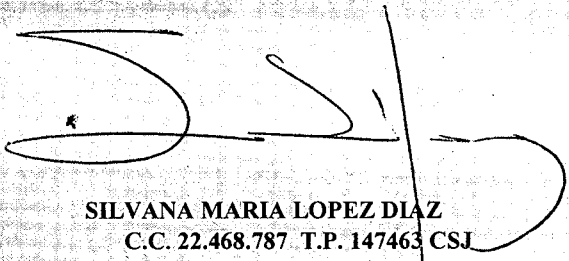
74. APODERADO SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO No. 14-171778- -00000-0000 Fecha: 2014-08-06 15:53:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 5 locación
---	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No. PCT/US2013/024995 Fecha 06 de Febrero de 2013			
Publicación Internacional No. WO 2013/119714 A1 Fecha 15 de Agosto de 2013			
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
ANTICUERPOS CD47 Y MÉTODOS DE USO LOS MISMOS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) C12P 21/08		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
INHIBRX LLC			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: 11099 N. Torrey Pines Road Suite 130 La Jolla,		No. TELÉFONO:	
CIUDAD: California 92037,		CORREO ELECTRONICO:	
PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estados Unidos de América	
7	INVENTOR (ES)		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1.ECKELMAN,		Brendan	Estadounidense
2.TIMMER,		John	Estadounidense
3.RAZAI,		Amir	Estadounidense
4.DEVERAUX,		Quinn	Estadounidense
5.JONES,		Kyle	Estadounidense
6.NGUY,		Peter, L.	Estadounidense
8	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN		CIUDAD	ESTADO
1. 11099 N. Torrey Pines Road Suite 280,		La Jolla,	California 92037,
2. 11099 N. Torrey Pines Road Suite 280,		La Jolla,	California 92037,
3. 11099 N. Torrey Pines Road Suite 280,		La Jolla,	California 92037,
4. 11099 N. Torrey Pines Road Suite 280,		La Jolla,	California 92037,
5. 11099 N. Torrey Pines Road Suite 280,		La Jolla,	California 92037,
6. 11099 N. Torrey Pines Road Suite 280,		La Jolla,	California 92037,
			PAÍS RESIDENCIA
			Estados Unidos de América
			Estados Unidos de América
			Estados Unidos de América
			Estados Unidos de América
			Estados Unidos de América
			Estados Unidos de América
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LOPEZ DIAZ		SIVANA MARIA	C.C.22.468.787 T.P. 147463 CSJ
DIRECCIÓN	Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6		No. TELÉFONO 6181088
CIUDAD	Bogotá, D.C.		CORREO
PAÍS	Colombia		ELECTRÓNICO notificaciones@clarkemodet.com.co
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
1.Estados Unidos de América		US	61/595.216
2.Estados Unidos de América		US	61/659.752
			(32) FECHA AAA/MM/DD
			2012/02/06
			2012/06/14

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 14-083531// 14-0	Fecha 05/08/2014 06/08/2014
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 SILVANA MARIA LOPEZ DIAZ C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción 2. ☒ Reivindicaciones 3. ☒ Dibujos y/o figuras 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.		9. ☐ Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0083531

Bogotá D.C., Agosto 05 de 2014 - 11:16:39

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 83.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	83520	05/08/2014		9.938.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-171778-00000-0000

Fecha: 2014-08-06 15:53:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mail: info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Agosto 5 de 2014 - 11:16:42

		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: <u>14</u> / <u>8</u> / <u>6.</u> AAAA MM DD	
		Recorrido: 4	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-171778	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD ☒
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

El cd anexo contiene un total de Archivos:
 (1) Archivo en formato PDF, los cuales fueron
 procesados en el folio 3, correctamente

Alfonso

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0084981

Bogotá D.C., Agosto 06 de 2014 - 13:39:38

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	58489	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58711	04/06/2014		62.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58800	04/06/2014		767.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58801	04/06/2014		767.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO

CONCEPTO

Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO

23 50005-01-01 SOLICITUDES

1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA
ADICIONAL A LAS 10 INIC

31.000.00

713.000.00

\$713.000.00

=====

SON: **SETECIENTOSTRECE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

**No. 14-171778- -00000-0000**Fecha: 2014-08-06 15:53:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Agosto 6 de 2014 - 13:39:39

X



No. 14-171778- -00000-0000

Fecha: 2014-08-06 15:53:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

6

ANTICUERPOS CD47 Y MÉTODOS DE USO LOS MISMOS**SOLICITUDES RELACIONADAS**

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la prioridad en
5 virtud de 35 U.S.C. § 119(e) para la Solicitud Provisional
Estadounidense No: 61/595,216, presentada el 6 de febrero de 2012
y para la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No.
61/659,752, presentada el 14 de junio de 2012. Cada una de estas
solicitudes se incorporan aquí mediante referencia en su
10 totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0002] Esta invención se relaciona de manera general con
15 anticuerpos monoclonales que reconocen CD47, más específicamente
con anticuerpos CD47 que no provocan un nivel significativo de
hemoaglutinación de glóbulos rojos humanos, con métodos para
generar estos anticuerpos, y con métodos para utilizar estos
anticuerpos monoclonales como productos terapéuticos.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0003] La CD47, también conocida como proteína asociada a
integrina (IAP), antígeno OA3 de cáncer de ovario, antígeno
25 relacionado con Rh y MER6, es un receptor de transmembrana de
múltiple expansión que pertenece a la superfamilia de
inmunoglobulina. La actividad y/o expresión de CD47 ha estado
implicada en una serie de enfermedades y trastornos. De acuerdo

con lo anterior, subsiste la necesidad de terapias que se dirigen CD47.

RESUMEN DE LA INVENCION

5

[0004] La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que reconocen y se unen a CD47, particularmente CD47 humano. Los anticuerpos de la invención son capaces de modular, por ejemplo, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar, neutralizar o de otra forma interferir con la expresión, actividad y/o señalización de CD47, y estos anticuerpos no provocan un nivel significativo de hemoaglutinación de glóbulos rojos humanos, también denominado aquí como eritrocitos. Sin embargo, la capacidad de los anticuerpos de la presente invención para unir CD47 en la superficie celular y no provocar un fenómeno de aglutinación celular no se limita a los glóbulos rojos. Los anticuerpos de la presente invención unen únicamente CD47 en una forma que no promueve la aglutinación de células CD47 positivas. Los anticuerpos de la invención y derivados de los mismos son capaces de modular, por ejemplo, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar, neutralizar o de otra forma interferir con la interacción entre CD47 y SIRP α (proteína α reguladora de señal), y estos anticuerpos no provocan un nivel significativo de hemoaglutinación de glóbulos rojos humanos. Los anticuerpos proporcionados aquí se denominan colectivamente como "anticuerpos CD47". Los anticuerpos CD47 de la invención son una mejora significativa sobre los anticuerpos CD47 existentes que provocan hemoaglutinación de glóbulos rojos humanos (Véase, por ejemplo, Kikuchi Y, Uno S, Yoshimura Y et al. A bivalent single-chain Fv

10
15
20
25

fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. Biochem Biophys Res Commun 2004; 315: 912-8). Por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención son una mejora significativa sobre los anticuerpos CD47 B6H12, BRC126, y CC2C6 existentes, cada uno de los cuales bloquea SIRP α , pero provoca hemoaglutinación de los RBC, como se describe en detalle adelante. Los anticuerpos CD47 IgG completos de la presente invención (por ejemplo, 2A1 y sus derivados humanizados incluyen aquellos proporcionados en la Tabla 1) no aglutinan las células a un nivel significativo. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención no hemaglutinan los glóbulos rojos (RBC). Se describen aquí los primeros anticuerpos CD47 en un formato IgG completo que bloquea SIRP α y no provoca un nivel significativo de aglutinación.

[0005] Los anticuerpos CD47 de la invención exhiben numerosas características deseables, tales como, por vía de ejemplo no limitante, potente bloqueador de la interacción entre CD47 y su ligando SIRP α , sin provocar un nivel significativo de hemoaglutinación de eritrocitos, así como también actividad anti-neoplásica potente. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención bloquean por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de la interacción entre CD47 y SIRP α cuando se compara con el nivel de interacción entre CD47 y SIRP α en la ausencia del anticuerpo CD47 descrito aquí.

[0006] Los anticuerpos CD47 de la invención no provocan un nivel significativo de aglutinación de células, por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención no provocan un nivel significativo de hemoaglutinación de los glóbulos rojos. En algunos casos, un nivel significativo de aglutinación de células se refiere al nivel de aglutinación en la presencia de los anticuerpos CD47 existentes. En un aspecto, el nivel de aglutinación en la presencia de los anticuerpos CD47 de la invención se reduce mediante por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, o por lo menos 99% comparado con el nivel de aglutinación en la presencia de los anticuerpos CD47 existentes. En algunas realizaciones, los anticuerpos CD47 de la invención no provocan un nivel significativo de aglutinación si el nivel de aglutinación en la presencia de los anticuerpos CD47 de la invención se reduce mediante por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, o por lo menos 99% comparado con el nivel de aglutinación en la presencia de los anticuerpos CD47 existentes. En otras realizaciones, los anticuerpos CD47 de la invención no provocan un nivel significativo de aglutinación si el nivel de aglutinación en la presencia de los anticuerpos CD47 de la invención se reduce mediante por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, o por lo menos 99% comparado con el nivel de aglutinación en la presencia del anticuerpo CD47, 1B4, que

comprende una secuencia de cadena ligera variable y pesada variable proporcionada en la SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81, respectivamente. Preferiblemente, los anticuerpos CD47 de la invención no provocan un nivel significativo de aglutinación de células en una concentración de anticuerpo de entre 10 pM y 10 μ M, por ejemplo, en una concentración de anticuerpo de 50 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 1 μ M, o 5 μ M.

[0007] Los anticuerpos de la presente invención también son significativamente más potentes en modelos neoplásicos comparados con los anticuerpos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la capacidad de las células neoplásicas de macrófagos a fagocitos en la presencia de los anticuerpos CD47 de la invención se aumenta mediante por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, o por lo menos 99% comparado con la capacidad de las células neoplásicas de macrófagos a fagocitos en la presencia de los anticuerpos CD47 existentes.

[0008] Aquellos expertos en la técnica reconocerán que es posible cuantificar, sin excesiva experimentación, el nivel de aglutinación, por ejemplo, el nivel de hemoaglutinación de RBC. Por ejemplo, aquellos expertos en la técnica reconocerán que el nivel de hemoaglutinación se comprueba al medir el área de un punto RBC después de realizar un ensayo de hemoaglutinación en la presencia de anticuerpos CD47 de la invención, como se describe en los Ejemplos adelante. En algunos casos, el área del punto RBC en la presencia del anticuerpo CD47 de la invención se compara

con el área del punto RBC en la ausencia de un anticuerpo CD47, es decir, en la presencia de hemoaglutinación cero. De esta forma, la hemoaglutinación se cuantifica con relación a un control de valores iniciales. Un área de punto RBC más grande
5 corresponde a un nivel mayor de hemoaglutinación. Alternativamente, también se puede utilizar la densitometría del punto RBC para cuantificar la hemoaglutinación.

[0009] Se describen aquí anticuerpos CD47 útiles para tratar,
10 retrasar la evolución de, evitar la recaída de o aliviar un síntoma de un cáncer u otra afección neoplásica. Por ejemplo, se describen aquí anticuerpos CD47 útiles para tratar cánceres hematológicos y/o tumores, por ejemplo, cánceres hematológicos y/o tumores. Por ejemplo, se describen aquí anticuerpos CD47
15 útiles para tratar tumores CD47+. Por vía de ejemplo no limitante, se describen aquí anticuerpos CD47 útiles para tratar linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielogenosa crónica (CML), mieloma múltiple (MM),
20 cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, leiomioma, leiomiosarcoma, glioma, glioblastoma, y así sucesivamente. Los tumores sólidos incluyen, por ejemplo, tumores de mama, tumores de ovario, tumores de
25 pulmón, tumores pancreáticos, tumores de próstata, tumores de melanoma, tumores colorectales, tumores de pulmón, tumores de cabeza y cuello, tumores de vejiga, tumores de esófago, tumores de hígado, y tumores de riñón.

[0010] Como se utiliza aquí, "cáncer hematológico" se refiere a un cáncer de la sangre, e incluye leucemia, linfoma y mieloma entre otros. "Leucemia" se refiere a un cáncer de la sangre en el que se hacen muchos glóbulos blancos que son inefectivos en pelear contra infecciones, desplazando así las otras partes que componen la sangre, tal como plaquetas y glóbulos rojos. Se entiende que los casos de leucemia se clasifican como aguda o crónica. Ciertas formas de leucemia incluyen, por vía de ejemplo no limitante, leucemia linfocítica aguda (ALL); leucemia mieloide aguda (AML); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia mielogenous crónica (CML); trastorno mieloproliferativo/neoplasma (MPDS); y síndrome de mielodisplasia. "Linfoma" se puede referir a un linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin indolente y agresivo, linfoma de Burkitt, y linfoma folicular (microcítico y no microcítico), entre otros. Mieloma se puede referir a mieloma múltiple (MM), mieloma de célula gigante, mieloma de cadena pesada, y de cadena ligera o mieloma Bence-Jones.

[0011] Los anticuerpos monoclonales de ejemplo de la invención incluyen, por ejemplo, los anticuerpos descritos aquí. Los anticuerpos de ejemplo incluyen los anticuerpos que tienen una cadena pesada variable seleccionada de la SEQ ID NOs: 5-30 y una cadena ligera variable seleccionada de la SEQ ID NOs: 31-47. Los anticuerpos también incluyen los anticuerpos que tienen una cadena pesada variable que es por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la secuencia establecida en por lo menos una de la SEQ ID NOs: 5-30 y una cadena ligera variable que es por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la secuencia

establecida en por lo menos una de la SEQ ID NOs: 31-47. Preferiblemente, los anticuerpos reconocen y se unen a CD47 humano y no provocan un nivel significativo de hemoaglutinación de glóbulos rojos humanos. Estos anticuerpos se denominan
5 respectivamente aquí como los anticuerpos CD47. Los anticuerpos CD47 incluyen anticuerpos monoclonales completamente humanos, así como también anticuerpos monoclonales humanizados y anticuerpos quiméricos. Estos anticuerpos muestran la especificidad para el CD47 humano, y se ha mostrado que modulan, por ejemplo, bloquean,
10 inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o de otra forma interfieren con la actividad, señalización y/o actividad de CD47 sin provocar un nivel significativo de hemoaglutinación de glóbulos rojos.

15 [0012] Los anticuerpos CD47 proporcionados aquí exhiben actividad inhibidora, por ejemplo al inhibir la expresión CD47 (por ejemplo, inhibir la expresión de la superficie celular de CD47), actividad, y/o señalización, o al interferir con la interacción entre CD47 y SIRP α . Los anticuerpos proporcionados aquí reducen
20 completamente o parcialmente o de otra forma modulan la expresión CD47 o actividad luego de unirse a, o de otra forma interactuar con, CD47, por ejemplo, un CD47 humano. La reducción o modulación de una función biológica de CD47 se completa, significativo, o parcial luego de la interacción entre los anticuerpos y el
25 polipéptido y/o péptido CD47 humano. Se considera que los anticuerpos inhiben completamente la expresión o actividad CD47 cuando el nivel de expresión o actividad CD47 en la presencia del anticuerpo se reduce mediante por lo menos 95%, por ejemplo, mediante 96%, 97%, 98%, 99% o 100% cuando se compara con el nivel

de expresión o actividad CD47 en la ausencia de interacción, por ejemplo, unión, con el anticuerpo descrito aquí. Se considera que los anticuerpos CD47 inhiben significativamente la expresión o actividad CD47 cuando el nivel de expresión o actividad CD47 en la presencia del anticuerpo CD47 se reduce mediante por lo menos 50%, por ejemplo, 55%, 60%, 75%, 80%, 85% o 90% cuando se compara con el nivel de expresión o actividad CD47 en la ausencia de la unión con un anticuerpo CD47 descrito aquí. Se considera que los anticuerpos inhiben parcialmente la expresión o actividad CD47 cuando el nivel de expresión o actividad CD47 en la presencia del anticuerpo se reduce mediante menos de 95%, por ejemplo, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% o 90% cuando se compara con el nivel de expresión o actividad CD47 en la ausencia de interacción, por ejemplo, unión, con un anticuerpo descrito aquí.

[0013] Los anticuerpos de la invención también incluyen anticuerpos monoclonales que unen específicamente CD47, en donde el anticuerpo no provoca un nivel significativo de aglutinación, por ejemplo, hemoaglutinación de glóbulos rojos ("hemoaglutinación RBC"). Los anticuerpos de la presente invención unen únicamente CD47 en una forma que no promueve la aglutinación de células CD47 positivas; sin embargo, la capacidad de los anticuerpos de la presente invención para unir CD47 en la superficie celular y no provocar un fenómeno de aglutinación celular no se limita a glóbulos rojos.

[0014] Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden incluir un anticuerpo de la invención y un

portador. Estas composiciones farmacéuticas se pueden incluir en equipos, tal como, por ejemplo, equipos diagnósticos.

[0015] La invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a CD47 o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, en donde el anticuerpo no provoca un nivel significativo de aglutinación de células después de administración, por ejemplo, el anticuerpo no provoca un nivel significativo de hemoaglutinación de glóbulos rojos después de administración. En algunas realizaciones, el anticuerpo es quimérico, humanizado, o completamente humano. En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen a CD47 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo evita que el CD47 interactúe con SIRP α . Se considera que los anticuerpos inhiben completamente la interacción de CD47 y SIRP α cuando el nivel de la interacción CD47/SIRP α en la presencia del anticuerpo se reduce mediante por lo menos 95%, por ejemplo, mediante 96%, 97%, 98%, 99% o 100% cuando se compara con el nivel de interacción CD47/SIRP α en la ausencia de interacción con el anticuerpo, por ejemplo, la unión con el anticuerpo. Se considera que los anticuerpos inhiben parcialmente la interacción CD47/SIRP α cuando el nivel de interacción CD47/SIRP α en la presencia del anticuerpo se reduce mediante menos de 95%, por ejemplo, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% o 90% cuando se compara con el nivel de interacción CD47/SIRP α en la ausencia de interacción con el anticuerpo, por ejemplo, la unión con el anticuerpo.

[0016] La cantidad de anticuerpo suficiente para tratar o evitar el cáncer en el sujeto es, por ejemplo, una cantidad que es

suficiente para reducir la señalización CD47 (Véase, por ejemplo, Yamauchi et al., 2013 Blood, Jan 4. [Epub ahead of print]; Soto-Pantoja et al., 2013 Expert Opin Ther Targets, 17: 89-103; Irandoust et al., 2013 PLoS One, Epub Jan 8; Chao et al., 2012 Curr Opin Immunol, 24 :225-32; Theocharides et al., 2012 J Exp Med, 209(10): 1883-99; Csanyi et al., 2012 Arterioscler Thromb Vase Biol, 32: 2966-73; Maxhimer et al., 2009 Sci Transl Med, 1: 3ra7; Sarfati et al., 2008 Curr Drug Targets, 9: 842-850; Miyashita et al., 2004 Mol Biol cell, 15: 3950-3963; E.J. Brown y W.A. Frazier, 2001 Trends cell Biol, 11 : 130-135; Oldenborg et al., 2001 J Exp Med, 193: 855-862; Blazar et al., 2001 J Exp Med, 194: 541-549; Oldenborg et al., 2000 Science, 288: 2051-2054; y Gao et al., 1996 J Biol Chem, 271 : 21-24). Por ejemplo, la cantidad de anticuerpo suficiente para tratar o evitar cáncer en el sujeto es una cantidad que es suficiente para reducir la señal inhibidora fagocítica en macrófagos generado por la interacción CD47/SIRP α en el eje de señalización CD47/SIRP α , es decir, el anticuerpo de la invención promueve la fagocitosis mediada por macrófago de una célula que expresa CD47. Como se utiliza aquí, el término “reduce” se refiere a una señalización CD47 reducida en la presencia del anticuerpo de la invención. La señalización mediada por CD47 se reduce cuando el nivel de señalización CD47 en la presencia de un anticuerpo CD47 de la invención es mayor que o igual a 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99%, o 100% menor que un nivel de control de señalización CD47 (es decir, el nivel de señalización CD47 en la ausencia del anticuerpo). El nivel de señalización CD47 se mide utilizando cualquiera de una variedad de técnicas estándar, tal como, por vía de ejemplo no limitante, la medición de la

activación del gen en la dirección 3', y/o los ensayos de reportero luciferasa que responden a la activación CD47. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que el nivel de señalización CD47 se puede medir utilizando una variedad de ensayos, que incluyen, por ejemplo, equipos comercialmente disponibles.

[0017] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo es un isotipo IgG. En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo es de isotipo IgG1 humano, que tiene una secuencia de aminoácidos:

```
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPE[LL]GG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN[ ] STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)
```

[0018] En algunas realizaciones, la región constante IgG1 humana se modifica en el aminoácido Asn297 (encerrada en cuadro, Numeración kabat) para evitar la glucosilación del anticuerpo, por ejemplo Asn297Ala (N297A). En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo se modifica en el aminoácido Leu235 (Numeración kabat) para alterar las interacciones del receptor Fc, por ejemplo Leu235Glu (L235E) o Leu235Ala (L235A). En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo se modifica en el aminoácido Leu234 (Numeración kabat) para alterar las interacciones del receptor Fc, por ejemplo, Leu234Ala (L234A). En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo se altera en el aminoácido 234 y 235, por ejemplo Leu234Ala y Leu235Ala (L234A/L235A) (Índice UE de Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest).

[0019] En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo es del isotipo IgG2 humano, que tiene una secuencia de aminoácidos:

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVR
KCCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQF[ ]STFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC
KVSNNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG
```

5

```
FYPSDISVEW ESNGQPENNY KITPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 2)
```

[0020] En algunas realizaciones, la región constante IgG2 humana se modifica en el aminoácido Asn297 (Encerrado en cuadro, Numeración kabat) para evitar la glucosilación del anticuerpo, por ejemplo, Asn297Ala (N297A).

10

[0021] En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo es del isotipo IgG3 humano, que tiene una secuencia de aminoácidos:

15

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHNKPS NTKVDKRVEL
KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC
DTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PREEQY[ ]STF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NIFSCSVMHE ALHN[ ]FTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 3)
```

[0022] En algunas realizaciones, la región constante IgG3 humana se modifica en el aminoácido Asn297 (Encerrado en cuadro, Numeración kabat) para evitar la glucosilación del anticuerpo, por ejemplo, Asn297Ala (N297A). En algunas realizaciones, la región constante IgG3 humana se modifica en el aminoácido 435

20

para extender la vida útil, por ejemplo, Arg435His (R435H) (Índice UE de Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest).

- 5 [0023] En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo es del isotipo IgG4 humano, que tiene una secuencia de aminoácidos:

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPFCFSCP APEFLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPFVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 4)
```

- 10 [0024] En algunas realizaciones, la región constante IgG4 humana se modifica dentro de la región bisagra para evitar o reducir el intercambio de hebra, por ejemplo, Ser228Pro (S228P). En otras realizaciones, la región constante IgG4 humana se modifica en el aminoácido 235 para alterar las interacciones del receptor Fc,
- 15 por ejemplo, Leu235Glu (L235E). En algunas realizaciones, la región constante IgG4 humana se modifica dentro de la región bisagra y en el aminoácido 235, por ejemplo, Ser228Pro y Leu235Glu (S228P/L235E). En algunas realizaciones, la región constante IgG4 humana se modifica en el aminoácido Asn297
- 20 (Numeración kabat) para evitar la glucosilación del anticuerpo, por ejemplo, Asn297Ala (N297A). (Índice UE de Rabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest).

- [0025] En algunas realizaciones, la región constante IgG humana
- 25 se modifica para mejorar la unión FcRn. Ejemplos de las

mutaciones Fc que mejoran la unión a FcRn son Met252Tyr, Ser254Thr, Thr256Glu (M252Y, S254T, T256E, respectivamente) (Numeración kabat, Dall'Acqua et al 2006,/. Biol Chem Vol 281(33) 23514-23524), o Met428Leu y Asn434Ser (M428L, N434S) (Zalevsky et al 2010 Nature Biotech, Vol 28(2) 157-159). (Índice UE de Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest). En algunas realizaciones, la región constante IgG humana se modifica para alterar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), por ejemplo, las modificaciones de aminoácido descritas en Natsume et al., 2008 Cancer Res, 68(10): 3863-72; Idusogie et al., 2001 J Immunol, 166(4): 2571-5; Moore et al., 2010 mAbs, 2(2): 181-189; Lazar et al., 2006 PNAS, 103(11): 4005-4010, Shields et al., 2001 JBC, 276(9): 6591-6604; Stavenhagen et al., 2007 Cancer Res, 67(18): 8882-8890; Stavenhagen et al., 2008 Advan. Enzyme Regul., 48: 152-164; Alegre et al, 1992 J Immunol, 148: 3461-3468; Revisado en Kaneko y Niwa, 2011 Biodrugs, 25(1): 1-11.

[0026] En algunas realizaciones, la región constante IgG humana se modifica para inducir heterodimerización. Por ejemplo, tiene una modificación de aminoácido dentro del dominio CH3 en Thr366, que cuando se reemplaza con un aminoácido más voluminoso, por ejemplo, Try (T366W), es capaz de ser preferiblemente par con un segundo dominio CH3 que tiene modificaciones de aminoácido con aminoácidos menos voluminosos en las posiciones Thr366, Leu368, y Tyr407, por ejemplo, Ser, Ala y Val, respectivamente (T366S/L368A/Y407V). La heterodimerización por medio de las modificaciones CH3 se puede estabilizar adicionalmente mediante la introducción de un enlace de disulfuro, por ejemplo al cambiar

Ser354 con Cys (S354C) y Y349 con Cys (Y349C) en dominios CH3 opuestos (Revisado en Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7-15).

5 [0027] La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más anticuerpos monoclonales que se unen a CD47 o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, en donde el anticuerpo no provoca un nivel significativo de hemoaglutinación de glóbulos rojos después de administración.

10

[0028] La hemoaglutinación es un ejemplo de una interacción homotípica, en donde se provoca que dos células que expresan CD47 agregan o agrupan cuando se tratan con una entidad de unión bivalente CD47. La capacidad de los anticuerpos de la presente
15 invención para unir CD47 en la superficie celular y no provocar un fenómeno de aglutinación celular no se limita a los glóbulos rojos. Se ha observado que los anticuerpos de la presente invención unen únicamente CD47 en una forma que no promueve la aglutinación de las estirpes celulares CD47 positivas, por
20 ejemplo, células Daudi.

[0029] En algunos casos, el anticuerpo que comprende una región de cadena pesada variable (VH) se selecciona del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 5-30. El anticuerpo comprende
25 opcionalmente una región de cadena liviana variable (VL) que se selecciona del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 31-47. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región de cadena VH que se selecciona del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 5-30 y una región de cadena VL que se selecciona del grupo que

consiste de las SEQ ID NOs: 31-47. Los anticuerpos de la invención también incluyen los anticuerpos que tienen una cadena pesada variable que es por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la secuencia establecida en por lo menos una de la SEQ ID NOs: 5-30 y una cadena ligera variable que es por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la secuencia establecida en por lo menos una de la SEQ ID NOs: 31-47. En otros aspectos, el anticuerpo comprende una región VH proporcionada en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 5, 7, 8, 11, 15-17, 20-22, y 27-30 pareadas con una región VL proporcionada en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 31-39, 42, 43, 44, y 47. En otra realización, el anticuerpo comprende una región VH proporcionada en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 5, 7, 8, 11, 12, 15-17, 20-22, y 27-30 pareadas con una región VL proporcionada en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 31, 32, 35, 40, 41, 42, 43, 44, y 47. En todavía otro aspecto, el anticuerpo comprende una combinación de una región de cadena VH y una región de cadena VL seleccionada de las combinaciones enumeradas en la Tabla 1.

20

[0030] En algunas realizaciones, el anticuerpo CD47 o fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende una secuencia de región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de VH establecida en la SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, o SEQ ID NO: 66, una secuencia de CDR2 de VH establecida en la SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, o SEQ ID NO: 76, una secuencia de CDR3 de VH establecida en la SEQ ID NO: 52 o

25

SEQ ID NO: 77, una secuencia de CDR1 de VL establecida en la SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67, o SEQ ID NO: 68, una secuencia de CDR2 de VL establecida en la SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, o SEQ ID NO: 71 y una secuencia de CDR3 de VL establecida en la SEQ ID NO: 55. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende una secuencia de CDR1 de VH establecida en la SEQ ID NO: 50, una secuencia de CDR2 de VH establecida en la SEQ ID NO: 51, una secuencia de CDR3 de VH establecida en la SEQ ID NO: 52, una secuencia de CDR1 de VL establecida en la SEQ ID NO: 53, una secuencia de CDR2 de VL establecida en la SEQ ID NO: 54, y una secuencia de CDR3 de VL establecida en la SEQ ID NO: 55. En otro ejemplo, el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende una secuencia de CDR1 de VH establecida en la SEQ ID NO: 50, una secuencia de CDR2 de VH establecida en la SEQ ID NO: 72, una secuencia de CDR3 de VH establecida en la SEQ ID NO: 52, una CDR1 de VL establecida en la SEQ ID NO: 53, una secuencia de CDR2 de VL establecida en la SEQ ID NO: 71, y una secuencia de CDR3 de VL establecida en la SEQ ID NO: 55.

20

[0031] En una realización, los anticuerpos de la presente invención se unen a CD47 en una cabeza para orientación lateral que posiciona la cadena pesada cerca a la membrana de célula que expresa CD47, mientras que la cadena ligera ocluye el sitio de unión SIRP α en CD47. En otra realización, los anticuerpos de la presente invención se unen a CD47 en una cabeza para orientación lateral que posiciona la cadena ligera cerca a la membrana de célula que expresa CD47, mientras que la cadena pesada ocluye el sitio de unión SIRP α en CD47.

25

[0032] Los anticuerpos CD47 se unen a un epítipo que incluye uno cualquiera de los residuos de aminoácido 1-116 de CD47 cuando se enumera de acuerdo con la SEQ ID NO: 147 (es decir, SEQ ID NO: 48
 5 que excluye la secuencia de señal (aminoácidos 1-18)). Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención se unen a un epítipo que incluye uno o más de residuos de aminoácido Q31, N32, T33, T34, E35, V36, Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, 147, Y48, T49, F50, D51, G52, A53, L54, N55, K56, S57, T58,
 10 V59, P60, T61, D62, F63, S64, S65, A66, K67, 168, E69, V70, S71, Q72, L73, L74, K75, G76, D77, A78, S79, L80, K81, M82, D83, K84, S85, D86, A87, V88, S89, H90, T91, G92, N93, Y94, T95, C96, E97, V98, T99, E100, L101, T102, R103, E104, G105, E106, T107, 1108, 1109, y 1110 de CD47 cuando se enumera de acuerdo con la SEQ ID
 15 NO: 147.

[0033] En algunos casos, los anticuerpos de la presente invención se unen a un epítipo discontinuo que incluye uno o más de los residuos de aminoácido Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44,
 20 R45, D46, 147, Y48, T49, F50, y D51 de CD47 cuando se enumera de acuerdo con la SEQ ID NO: 147. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención se unen a un epítipo discontinuo que comprende los residuos de aminoácidos Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104, o E106 de CD47 cuando se enumera
 25 de acuerdo con la SEQ ID NO: 147. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención se unen a un epítipo discontinuo que incluye por lo menos los residuos de bucle KGRD (SEQ ID NO: 56) (residuos 43-46) de CD47 cuando se enumera de acuerdo con la SEQ ID NO: 147. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención

se unen a un epítopo discontinuo que incluye por lo menos residuos Y37, K39, K41, el bucle KGRD (SEQ ID NO: 56) (residuos 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104, y E106 de CD47 cuando se enumera de acuerdo con la SEQ ID NO: 147. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención se unen a un epítopo discontinuo que incluye los residuos Y37, K39, K41, el bucle KGRD (SEQ ID NO: 56) (residuos 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104, y E106 de CD47 cuando se enumera de acuerdo con la SEQ ID NO: 147.

[0034] La región VH de los anticuerpos CD47 descrita aquí está implicada principalmente en la unión al bucle KGRD (SEQ ID NO: 56) de CD47. Sin embargo, el único epítopo en el que los anticuerpos de la presente invención se unen está en el lado de CD47. En contraste a los anticuerpos CD47 existentes conocidos en la técnica, la orientación del dominio VH de los anticuerpos CD47 descritos aquí en una posición próxima de membrana es una característica crítica de estos anticuerpos que evita la aglutinación celular, por ejemplo, hemoaglutinación de glóbulos rojos, al restringir los anticuerpos de tal manera que no pueden puentear las moléculas CD47 en células adyacentes. Adicionalmente, en razón a que el dominio VK de los anticuerpos CD47 descritos aquí interactúa con residuos apicales tal como Y37, T102, y E104, que están implicados en la unión SIRP α , es principalmente el dominio VK que precluye físicamente la unión SIRP α a CD47.

[0035] También se proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que compite con los

anticuerpos CD47 descritos aquí para evitar que el CD47 interactúe con SIRP α .

[0036] La invención proporciona un polipéptido que comprende
 5 residuos de aminoácidos Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104, y E106 de CD47 cuando se enumera de acuerdo con la SEQ ID NO: 147. También se proporciona un polipéptido que comprende uno cualquiera de los residuos de aminoácido 1-116 de CD47 cuando se enumera de acuerdo con la SEQ
 10 ID NO: 147. Por ejemplo, el polipéptido comprende uno o más de los residuos de aminoácido Q31, N32, T33, T34, E35, V36, Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, 147, Y48, T49, F50, D51, G52, A53, L54, N55, K56, S57, T58, V59, P60, T61, D62, F63, S64, S65, A66, K67, 168, E69, V70, S71, Q72, L73, L74, K75, G76,
 15 D77, A78, S79, L80, K81, M82, D83, K84, S85, D86, A87, V88, S89, H90, T91, G92, N93, Y94, T95, C96, E97, V98, T99, E100, L101, T102, R103, E104, G105, E106, T107, 1108, 1109, y E110 de CD47 cuando se enumera de acuerdo con la SEQ ID NO: 147. También se proporcionan métodos para utilizar este polipéptido como un
 20 antígeno, por ejemplo, un antígeno que se une al anticuerpo CD47.

[0037] La invención también proporciona métodos para aliviar un síntoma de un cáncer o otra afección neoplásica al administrar a un sujeto en necesidad del mismo uno o más anticuerpos
 25 monoclonales que se unen a CD47 o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, en donde el anticuerpo no provoca un nivel significativo de hemoaglutinación de glóbulos rojos después de administración. El anticuerpo se administra en una cantidad suficiente para aliviar el síntoma del cáncer u otra afección

neoplásica en el sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo es quimérico, humanizado, o completamente humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a CD47 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo evita que el CD47 interactúe con SIRP α . En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo es un isotipo IgG que se selecciona del grupo que consiste de isotipo IgG1, isotipo IgG2, isotipo IgG3, e isotipo IgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo es un isotipo IgG seleccionado de IgG4P e IgGPE.

[0038] En algunas realizaciones, los anticuerpos CD47 se describen aquí utilizados en conjunto con uno o más agentes adicionales o una combinación de agentes adicionales. Los agentes adicionales adecuados incluyen terapias quirúrgicas y/o farmacéuticas corrientes para una aplicación pretendida, tal como, por ejemplo, cáncer. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos CD47 en conjunto con uno o más agentes anti-neoplásicos o quimioterapéuticos adicionales. Alternativamente, el agente quimioterapéutico adicional es radioterapia. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un agente que induce la muerte celular. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico induce una pérdida de asimetría de fosfolípido a través de la membrana de plasma, por ejemplo provoca exposición de superficie celular de fosfatidilserina (PS). En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico induce la tensión del retículo endoplásmico (ER). En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de proteasoma. En algunas

realizaciones, el agente quimioterapéutico induce la translocación de las proteínas ER a la superficie celular. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico induce la translocación y la exposición de la superficie celular de calreticulina.

[0039] En algunas realizaciones, el anticuerpo CD47 y el agente adicional se formulan en una composición terapéutica única, y el anticuerpo CD47 y el agente adicional se administran simultáneamente. Alternativamente, el anticuerpo CD47 y el agente adicional se separan uno del otro, por ejemplo, cada uno se formula en una composición terapéutica separada, y el anticuerpo CD47 y el agente adicional se administran simultáneamente, o el anticuerpo CD47 y el agente adicional se administran en diferentes momentos durante un régimen de tratamiento. Por ejemplo, el anticuerpo CD47 se administra antes de la administración del agente adicional, el anticuerpo CD47 se administra posterior a la administración del agente adicional, o el anticuerpo CD47 y el agente adicional se administran en una forma alterna. Como se describe aquí, el anticuerpo CD47 y el agente adicional se administran en una única dosis o en múltiples dosis.

[0040] Un experto en la técnica apreciará que los anticuerpos de la invención tienen una variedad de usos. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se utilizan como agentes terapéuticos, como reactivos en equipos diagnósticos o como herramientas diagnósticas, o como reactivos en ensayos de competición para generar reactivos terapéuticos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0041] La Figura 1A es una gráfica que describe la unión de CD47 en células Daudi por los anticuerpos en sobrenadantes de hibridoma como se evalúa por citometría de flujo. La Figura IB es una gráfica que muestra la capacidad de algunos de los anticuerpos CD47 dentro del sobrenadante de hibridoma para bloquear la unión del SIRP α humano recombinante al CD47 humano recombinante, como se determina por un ELISA.

10

[0042] La Figura 2 es una serie de gráficas que describe (A) la unión de anticuerpos CD47 de murino purificados a células Raji, una estirpe cultivada de células linfoblastoides derivadas de un linfoma Burkitt, y (B) células CCRF-CEM, una estirpe celular similar a linfoblasto de célula T humana CD47 positiva, según se analiza mediante citometría de flujo. Este experimento compara la unión de los anticuerpos de murino de la presente invención con los anticuerpos CD47, B6H12 y 2D3 comercialmente disponibles.

20 [0043] La Figura 3 es una serie de gráficas que describe la capacidad de los anticuerpos CD47 para bloquear la unión SIRP α utilizando (A) un ELISA con la proteína humana recombinante, o (B) mediante citometría de flujo utilizando células CCRF-CEM y la proteína de SIRP α humano recombinante.

25

[0044] La Figura 4 es una serie de fotografías, gráficas, y una tabla que muestra la hemoaglutinación RBC mediante anticuerpos CD47. La hemoaglutinación RBC se evidencia por una apariencia nubosa en el pozo, mientras que el RBC no aglutinado no parece

puntiforme. La Figura 4A muestra que el anticuerpo 2A1 no exhibe hemoaglutinación en todas las concentraciones probadas. El índice de hemoaglutinación se describe en la gráfica. La Figura 4B muestra que 2A1 es raro entre muchos anticuerpos CD47 en su incapacidad de aglutinar los RBC. También se muestra la falta de actividad de aglutinación mediante la versión quimérica humana de 2A1 (2A1-xi). La Figura 4C muestra que el anticuerpo monoclonal CD47 2D3, que no bloquea SIRP α , no provoca hemoaglutinación. La Figura 4D muestra un rango de alta concentración de los anticuerpos CD47 en el ensayo de hemoaglutinación y demuestra el efecto pro-zona. El índice de hemoaglutinación se describe en la gráfica. La Figura 4E demuestra el rango de concentración más angosto para hemoaglutinación por el anticuerpo CD47, 1B4, mientras que este efecto está ausente luego de unión 2A1. La Figura 4F muestra que 2A1, 2A1 quimérico (2A1-xi), y las variantes humanizadas no provocan hemoaglutinación. En la mayor parte de los experimentos el anticuerpo 9E4 y el anticuerpo B6H12 comercial se utilizan como controles positivos para hemoaglutinación. Otros anticuerpos comercialmente disponibles utilizados en estos ensayos son los anticuerpos de bloqueo SIRP α , BRC126 y CC2C6, y el anticuerpo de bloqueo no SIRP α , 2D3.

[0045] La Figura 5 es una gráfica que muestra 2A1 y la unión B6H12 a células B de macaco de Java (cino) y Raji, como se evalúa por citometría de flujo. El 2A1 se une al CD47 humano y cino con afinidad equivalente, como lo hace el B6H12, aunque con afinidad menor para CD47 humano y cino que 2A1.

[0046] La Figura 6 es una gráfica que describe la unión de 2A1, 2A1-xi, y B6H12 a células Raji, como se evalúa por citometría de flujo. De forma importante, la gráfica muestra que las secuencias de región variable de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) se elucidan correctamente en la versión quimérica de 2A1.

[0047] La Figura 7A-7J es una serie de gráficas que muestra la unión de variantes humanizadas de 2A1 a células Raji. Se utiliza 2A1-xi como un control interno en la mayor parte de las gráficas. Se prueban numerosas combinaciones de las cadenas pesada y ligera como se describe en el Ejemplo 8.

[0048] La Figura 8A es imagen de la traza de cromatografía de exclusión utilizando un AKTA FLPC con una columna superdex200. Se muestran las variantes IgG1, IgG4P, y IgGPE del anticuerpo AB6.12. Todas las tres variantes son casi 97% monoméricas. La Figura 8B es una fotografía de gel SDS-PAGE teñido con azul coomassie de numerosas variantes humanizadas de 2A1 bajo condiciones de reducción (R) y no reducción (NR).

[0049] La Figura 9 es una serie de gráficas que describe la capacidad de los anticuerpos CD47 para promover la fagocitosis de estirpes celulares de tumor humano mediante macrófagos derivados de monocito humanos (MDM). La Figura 9A es una gráfica que muestra el índice fagocítico, en donde los anticuerpos utilizados son el anticuerpo B6H12 comercial, el anticuerpo de murino 2A1, un anticuerpo humanizado variante AB2.05, y el anticuerpo 2D3 comercial de no bloqueo. La Figura 9B es una gráfica que muestra el índice fagocítico, en donde los anticuerpos utilizados son el

anticuerpo B6H12 comercial, el anticuerpo AB2.05 humanizado (IgG1 humano), y las variantes IgG1, IgG4P, y IgG4PE del anticuerpo AB6.12 humanizado. Se utilizan células CCRF-CEM como la estirpe celular objetivo CD47 en estos experimentos.

5

[0050] La Figura 10 es una serie de gráficas que muestra los efectos anti-neoplásicos de los anticuerpos CD47 en un modelo de tumor Raji. La Figura 10A es una gráfica que muestra la eficacia de los anticuerpos de murino 9E4, 1B4, 2A1, y el anticuerpo B6H12 comercial. La Figura 10B es una gráfica que muestra la eficacia de los isotipos IgG1, IgG4P, y IgG4PE del anticuerpo AB6.12 humanizado, junto con el anticuerpo 2A1 de murino. En ambos modelos, los ratones se trataron con dosis de 200 µg de anticuerpo tres veces a la semana.

15

[0051] La Figura 11 es una representación gráfica de los complejos de co-cristal de CD47- IgV con el dominio SIRP α -IgV (A, (Banco de Datos de Proteína (PDB) Referencia No. 2JJS), B6H12 (B), y 2A1 (C). El 2A1 y B6H12 se unen en muchas orientaciones diferentes y distintos epítomos en CD47, ambos de los cuales se sobreponen con el sitio de unión SIRP α . El anticuerpo 2A1 se une en una cabeza para orientación lateral en la proteína CD47.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0052] La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que unen específicamente CD47, incluyendo CD47 humano. Estos anticuerpos se denominan colectivamente aquí como anticuerpos CD47.

25

[0053] El CD47, un receptor de transmembrana de múltiple expansión que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulina, interactúa con SIRP α (proteína α reguladora de señal) en macrófagos y por lo tanto atenúa la fagocitosis. Las células de

5 cáncer que eligen esta ruta evaden la fagocitosis. Como se describe en detalle adelante, este es un nuevo mecanismo de evasión inmune de tumor, y que dirige terapéuticamente CD47 tiene una amplia aplicación en numerosos cánceres.

10 [0054] La expresión de CD47 se correlaciona con los resultados clínicos peores en muchos cánceres distintos que incluyen Linfoma No Hodgkin (NHL), Leucemia linfocítica aguda (ALL), Leucemia Mielogenosa Aguda (AML), cáncer de ovario, glioma, glioblastoma, etc. Adicionalmente, se ha identificado CD47 como un marcador

15 celular de cáncer en leucemias y tumores sólidos (Jaiswal et al., 2009 cell, 138(2): 271-85; Chan et al., 2009 Proc Natl Acad Sci USA, 106(33): 14016-21; Chan et al., 2010 Curr Opin Urol, 20(5): 393-7; Majeti R et al., 2011 Oncogene, 30(9): 1009-19).

20 [0055] Los anticuerpos que bloquean CD47 han demostrado actividad anti-neoplásica múltiple en modelos de tumor in vivo. Adicionalmente, se ha mostrado que estos anticuerpos sinergizan con otros anticuerpos terapéuticos que incluyen Rituxan® y Heerceptin® en modelos neoplásicos. La interacción de bloqueo d

25 CD47 con SIRP α es capaz de promover la fagocitosis de células que expresan CD47 por los macrófagos (revisado en Chao et al., 2012 Curr Opin Immunol, 24(2): 225-32). Los ratones que carecen de CD47 son marcadamente resistentes a terapia de radiación, lo que sugiere una función para dirigir CD47 en combinación con

radioterapia (Isenberg et al., 2008 Am J Pathol, 173(4): 1100-1112; Maxhimer et al., 2009 Sci Transl Med, 1(3): 3ra7). Adicionalmente, los modelos de tumor singeneicos en estos ratones exhiben metástasis ósea reducida comparada con ratones tipo
 5 natural (Uluckan et al., 2009 Cancer Res, 69(7): 3196-204).

[0056] De forma importante, se ha reportado que la mayor parte de los anticuerpos CD47 provocan hemoaglutinación de eritrocitos humanos. La hemoaglutinación es un ejemplo de una interacción
 10 homotípica, en donde se provoca que dos células que expresan CD47 se agreguen o agrupen cuando se tratan con una entidad de unión bivalente CD47. Por ejemplo, el anticuerpo CD47, MABL, como un IgG o F(ab')₂ completo, se ha reportado que provoca hemoaglutinación de eritrocitos, y, solo cuando se altera MABL en
 15 un scFv o scFv bivalente, este efecto se mitiga. (Véase por ejemplo, Uno S, Kinoshita Y, Azuma Y et al. Antitumor activity of a monoclonal antibody against CD47 in xenograft models of human leukemic. Oncol Rep 2007; 17: 1189-94; Kikuchi Y, Uno S, Yoshimura Y et al. A bivalent single-chain Fv fragment against
 20 CD47 induces apoptosis for leukemic cells. Biochem Biophys Res Commun 2004; 315: 912-8). Otros anticuerpos CD47 conocidos que incluyen B6H12, BRC126, y CC2C6 también provocan hemoaglutinación de los RBC, como se describe en detalle adelante. Sin embargo, la agregación de células representa una mayor limitación de CD47
 25 dirige terapéuticamente con los anticuerpos IgG completamente existentes.

[0057] Más aún, una característica importante de los anticuerpos CD47 es la capacidad de bloquear la interacción de CD47 y SIRP α

con el fin de promoverla fagocitosis de las células que expresan CD47 mediante los macrófagos. Muchos anticuerpos CD47 existentes bloquean SIRP α ; sin embargo, antes de la invención descrita aquí, los anticuerpos existentes que bloquean SIRP α provocan el efecto
5 colateral de hemoaglutinación, que, como se describió anteriormente, es indeseable. Otros anticuerpos existentes, tal como 2D3, no provocan hemoaglutinación; sin embargo, estos anticuerpos tampoco bloquean SIRP α , haciéndolos inefectivos en la promoción de fagocitosis. Sin embargo, antes de la invención
10 descrita aquí, se presenta una necesidad urgente de identificar anticuerpos CD47 que bloquean SIRP α sin provocar agrupación celular.

[0058] Los anticuerpos CD47 de la presente invención evitan el
15 efecto indeseado de hemoaglutinación, reduciendo por lo tanto la eficacia de CD47 terapéuticamente dirigido, y mantener la capacidad de bloquear la interacción de CD47 con SIRP α , promoviendo por lo tanto la fagocitosis de las células que expresan CD47. Específicamente, los anticuerpos CD47 IgG
20 completos de la presente invención (por ejemplo, 2A1 y sus derivados humanizados que incluyen aquellos proporcionados en la Tabla 1) no aglutinan células a un nivel significativo. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención no hemaglutinan los RBC a un nivel significativo. Se describen aquí los primeros
25 anticuerpos CD47 en un formato IgG completo que bloquea SIRP α y no provocan un nivel significativo de hemoaglutinación. Tomados juntos, los anticuerpos de la invención (por ejemplo, el anticuerpo 2A1 y sus derivados humanizados) son únicos entre los

anticuerpos CD47 existentes en su capacidad de bloquear SIRP α , pero no provocan un nivel significativo de hemoaglutinación.

[0059] Los anticuerpos CD47 de la invención exhiben numerosas
5 características deseables, tal como, por vía de ejemplo no limitante, potente bloqueador de la interacción entre CD47 y su ligando SIRP α , sin provocar un nivel significativo de o de otra forma modular la hemoaglutinación de eritrocitos, así como también actividad anti-neoplásica potente. Por ejemplo, los
10 anticuerpos CD47 de la invención bloquean por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% de la interacción entre CD47 y SIRP α cuando se compara con el
15 nivel de interacción entre CD47 y SIRP α en la ausencia de el anticuerpo CD47 descrito aquí. Los anticuerpos CD47 de la invención no provocan un nivel significativo de aglutinación de células, por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención no provocan un nivel significativo de hemoaglutinación de glóbulos
20 rojos. Por ejemplo, el nivel de aglutinación en la presencia de los anticuerpos CD47 de la invención se reduce mediante por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, o por lo menos 99%
25 comparado con el nivel de aglutinación en la presencia de los anticuerpos CD47 existentes. En algunas realizaciones, los anticuerpos CD47 de la invención no provocan un nivel significativo de aglutinación si el nivel de aglutinación en la presencia de los anticuerpos CD47 de la invención se reduce

mediante por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, o por lo menos 99% comparado con el nivel de aglutinación en la presencia del anticuerpo CD47, 1B4, que comprende una secuencia de cadena ligera variable y pesada variable proporcionada en la SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81, respectivamente. Los anticuerpos de la presente invención también son significativamente más potentes en modelos neoplásicos comparado con los anticuerpos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la capacidad de las células neoplásicas de macrófagos a fagocitos en la presencia de Anticuerpos CD47 de la invención se aumenta mediante por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, o por lo menos 99% comparado con la capacidad de las células neoplásicas de macrófagos a fagocitos en la presencia de los anticuerpos CD47 existentes.

[0060] Aquellos expertos en la técnica reconocerán que es posible cuantificar, sin excesiva experimentación, el nivel de aglutinación, por ejemplo, el nivel de hemoaglutinación de los RBC. Por ejemplo, aquellos expertos en la técnica reconocerán que el nivel de hemoaglutinación se comprueba al medir el área de un RBC después de realizar un ensayo de hemoaglutinación en la presencia de los anticuerpos CD47 de la invención, como se describe en los Ejemplos adelante. En algunos casos, el área del punto RBC en la presencia del anticuerpo CD47 de la invención se compara con el área del punto RBC en la ausencia de un anticuerpo CD47, es decir, en la presencia de hemoaglutinación cero. De esta

forma, hemoaglutinación se cuantifica con relación a un control de valores iniciales. Un área de punto RBC más grande corresponde a un nivel mayor de hemoaglutinación. Alternativamente, la densitometría del punto RBC también se puede utilizar para
5 cuantificar hemoaglutinación.

[0061] Los anticuerpos CD47 de la invención se unen a CD47 humano y bloquean su interacción con SIRP α (Figuras IB, 3, y 7J). Estos anticuerpos no provocan un nivel significativo de
10 hemoaglutinación de eritrocitos humanos (Figura 4). Estos anticuerpos son capaces de promover la fagocitosis de células neoplásicas mediante macrófagos (Figura 9). Adicionalmente, los anticuerpos CD47 exhiben actividad anti-neoplásica potente en un modelo de ratón de linfoma humano (Figura 10). Sin embargo, los
15 anticuerpos CD47 de la invención eluden un factor limitante principal para el CD47 objetivo terapéutico. De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos CD47 de la invención son de gran importancia en el tratamiento de una multitud de cánceres.

20 [0062] Los anticuerpos de la invención que unen específicamente CD47 humano, bloquean, inhiben, interrumpen o de otra forma modulan la interacción entre el CD47 humano y el SIRP α humano, sin provocar un nivel significativo de o de otra forma modular la hemoaglutinación de eritrocitos.

25

[0063] Los anticuerpos de la presente invención se unen a un epítipo CD47 con una constante de unión de equilibrio (K_d) de ≤ 1 μ M, por ejemplo, ≤ 100 nM, preferiblemente ≤ 10 nM, y más preferiblemente ≤ 1 nM. Por ejemplo, los anticuerpos CD47

proporcionados aquí exhiben un K_d en el rango entre aproximadamente ≤ 1 nM a aproximadamente 1 pM.

[0064] Los anticuerpos CD47 de la invención sirven para modular, 5 bloquear, inhibir, reducir, antagonizar, neutralizar o de otra forma interferir con la actividad funcional del CD47 ampliamente distribuido. Las actividades funcionales de CD47 incluyen por ejemplo, señalización por medio de la interacción con SIRP α , modular, por ejemplo, aumentar, la concentración de calcio 10 intracelular luego de la adhesión celular a la matriz extracelular, interactuando con el dominio de unión celular de terminal C de trombospondina, que interactúa con fibrinógeno, e interactúa con diversas integrinas. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 inhiben completamente o parcialmente la actividad funcional 15 CD47 al modular completamente o parcialmente, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar, neutralizar, o de otra forma interferir con la unión de CD47 a SIRP α .

[0065] Se considera que los anticuerpos CD47 modulan 20 completamente, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o de otra forma interfieren con la actividad funcional CD47 cuando el nivel de la actividad funcional CD47 en la presencia del anticuerpo CD47 se reduce mediante por lo menos 95%, por ejemplo, mediante 96%, 97%, 98%, 99% o 100% cuando se 25 compara con el nivel de actividad funcional CD47 en la ausencia de la unión con un anticuerpo CD47 descrito aquí. Se considera que los anticuerpos CD47 bloquean significativamente, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o de otra forma interfieren con la actividad funcional CD47 cuando el nivel de actividad CD47 en

la presencia del anticuerpo CD47 se reduce mediante por lo menos 50%, por ejemplo, 55%, 60%, 75%, 80%, 85% o 90% cuando se compara con el nivel de actividad CD47 en la ausencia de la unión con un anticuerpo CD47 descrito aquí. Se considera que los anticuerpos CD47 modulan parcialmente, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o de otra forma interfieren con la actividad funcional CD47 cuando el nivel de actividad CD47 en la presencia del anticuerpo CD47 se reduce mediante menos de 95%, por ejemplo, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% o 90% cuando se compara con el nivel de actividad CD47 en la ausencia de la unión con un anticuerpo CD47 descrito aquí.

Definiciones

[0066] A menos que se defina de otra forma, los términos científicos y términos utilizados en conexión con la presente invención deben tener los significados que se entienden comúnmente por aquellos medianamente versados en la técnica. Adicionalmente, a menos que se requiera de otra forma por el contexto, los términos singulares deben incluir pluralidades y los términos plurales deben incluir el singular. De manera general, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo de tejido y celular, biología molecular, y química e hibridación de proteína y oligo- o polinucleótido se describen aquí por aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótido, y cultivo de tejido y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las técnicas de purificación y reacciones enzimáticas se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se lleva a

cabo comúnmente en la técnica o como se describe aquí. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan de manera general de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias
5 generales y más específicas que se citan y se discuten a través de la presente especificación. Véase por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos de
10 laboratorio y técnicas, química analítica, química orgánica sintética, y medicinal y la química farmacéutica se describen aquí por aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación, y
15 suministro, y tratamiento de pacientes.

[0067] Como se utiliza de acuerdo con la presente descripción, los siguientes términos, a menos que se indique de otra forma, se debe entender que tiene los siguientes significados:

20

[0068] Como se utiliza aquí, los términos CD47, proteína asociada a integrina (IAP), antígeno OA3 de cáncer de ovario, antígeno relacionado con Rh y MER6 son sinónimos y se pueden utilizar de forma intercambiable.

25

[0069] Los términos glóbulos rojos y eritrocitos son sinónimos y se utilizan de forma intercambiable.

[0070] El término aglutinación se refiere a una aglutinación celular, mientras que el término hemoaglutinación se refiere a la aglutinación de un subconjunto específico de células, es decir, glóbulos rojos. Sin embargo, la hemoaglutinación es un tipo de
5 aglutinación.

[0071] Como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contiene
10 un sitio de unión de antígeno que unen específicamente (inmunoreactivos con) un antígeno. "Se une específicamente" o "inmunoreacciona con" "se dirige contra" significa el anticuerpo que reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona con otros polipéptidos o se une
15 con menor afinidad ($K_d > 10^{-6}$). Los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, policlonal, monoclonal, quimérico, dAb (anticuerpo de dominio), cadena sencilla, Fab, fragmentos Fab- y F(ab')₂, Fv, scFvs, y una colección de expresión Fab.

[0072] Se sabe que la unidad estructural básica de anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción de terminal amino de cada
20 cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígeno. La porción de terminal carboxi de cada cadena define una región constante principalmente responsable para función efectora. En general, las moléculas de anticuerpo obtenidas de

humanos se relacionan con cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE y IgD, que difieren una de la otra en naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases tienen subclases también, tal como IgG1, IgG2, y otros. Adicionalmente, en
5 humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

[0073] El término “anticuerpo monoclonal” (MAb) o “composición de anticuerpo monoclonal”, como se utiliza aquí, se refiere a una
10 población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste de un producto de gen de cadena ligera única y un producto de gen de cadena pesada único. En particular, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas
15 en todas las moléculas de la población. Los MAb contienen un sitio de unión a antígeno capaz de inmunoreaccionar con un epítipo particular del antígeno caracterizado por una única afinidad de unión para este.

20 [0074] En general, las moléculas de anticuerpo obtenidas de humanos se relaciona con cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE y IgD, que difieren una de la otra por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases tienen subclases también, tal como IgG1, IgG2, y otros. Adicionalmente,
25 en humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

[0075] El término “sitio de unión a antígeno” o “porción de unión” se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina

que participa en unión de antígeno. El sitio de unión a antígeno se forma mediante residuos de aminoácido de las regiones variables de terminal N ("V") de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera, denominado como "regiones hipervariables," se interponen entre tramos que flanquean más conservados conocido como "regiones de estructura," o "FR". Sin embargo, el término "FR" se refiere una secuencia de aminoácidos que se encuentran en forma natural entre, y adyacente a, regiones hipervariables en inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada se disponen con relación una a la otra en espacio tridimensional para formar una superficie de unión a antígeno. La superficie de unión a antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno de unión, y las regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y ligera se denominan como "regiones determinantes de complementariedad," o "CDR." La asignación de los aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de las Secuencias Kabat de Proteínas de Interés Inmunológico (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989).

25

[0076] Como se utiliza aquí, el término "epítipo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de unión específica a una inmunoglobulina o fragmento del mismo, o un receptor de célula T. El término "epítipo" incluye cualquier determinante de

proteína capaz de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de célula T. Los determinantes epitópicos usualmente consisten de agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tal como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen usualmente características estructurales tridimensionales específicas, así como también características de carga específica. Se dice que un anticuerpo une específicamente un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$; por ejemplo, $\leq 100 \text{ nM}$, preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$ y más preferiblemente $\leq 1 \text{ nM}$.

[0077] Como se utiliza aquí, los términos “unión inmunológica,” y “propiedades de unión inmunológica” se refiere a las interacciones no covalentes del tipo que ocurre entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La resistencia, o afinidad de las interacciones de unión inmunológica se puede expresar en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, en donde un K_d más pequeño representa una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunológicas de los polipéptidos seleccionados se pueden cuantificar utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de dichos métodos implica medir los índices de formación de complejo de antígeno/sitio de unión a antígeno y disociación, en donde aquellas tasas dependen de las concentraciones de los socios de complejo, la afinidad de la interacción, y los parámetros geométricos que influyen igualmente la tasa en ambas direcciones. Sin embargo, se puede determinar “constante de asociación” (k_{on}) y “constante de disociación” (k_{off}) se puede determinar mediante el cálculo de las

concentraciones y las tasas actuales de asociación y disociación. (Véase Nature 361: 186-87 (1993)). La relación de $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ permite la cancelación de todos los parámetros no relacionado con la afinidad, y es igual a la constante de disociación K_d . (Véase, 5 generalmente, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Se dice que un anticuerpo de la presente invención se une específicamente a CD47, cuando la constante de unión de equilibrio (K_d) es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$, más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$, y más preferiblemente $\leq 100 \text{ pM}$ a 10 aproximadamente 1 pM , cuando se mide mediante ensayos tal como ensayos de unión de radioligando, resonancia de plasmón de superficie (SPR), ensayo de citometría de flujo unión, o ensayos similares conocidos por aquellos expertos en la técnica.

15 [0078] El término "polinucleótido aislado" como se utiliza aquí debe significar un polinucleótido de cADN genómico, o de origen sintético o alguna combinación de los mismos, que por virtud de su origen el "polinucleótido aislado" (1) no se asocia con todo o una parte de un polinucleótido en el que el "polinucleótido 20 aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) se une operablemente a un polinucleótido que no está ligado en la naturaleza, o (3) no ocurre en la naturaleza como parte de una secuencia más larga.

[0079] El término "proteína aislada" se denomina aquí como una 25 proteína de cADN, ARN recombinante, o de origen sintético o cualquier combinación de los mismos, que por virtud de su origen, o fuente de derivación, la "proteína aislada" (1) no se asocia con proteínas encontradas en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de

proteínas marinas, (3) se expresa mediante una célula de una especie diferente, o (4) no ocurre en la naturaleza.

[0080] El término "polipéptido" se utiliza aquí como un término genérico que se refiere a la proteína natural, fragmentos, o análogos de una secuencia de polipéptido. Por lo tanto, los fragmentos de proteína natural, y análogos son especies del género de polipéptido.

[0081] El término "que ocurre en forma natural" como se utiliza aquí cuando se aplica a un objeto se refiere al hecho que se puede encontrar un objeto en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (que incluye virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio o de otra forma ocurre en forma natural.

[0082] El término "ligado operablemente" como se utiliza aquí se refiere a posiciones de componentes así descritas que están en una relación que les permite funcionar en su forma pretendida. Una secuencia de control "ligada operablemente" a una secuencia codificante se liga de tal forma que la expresión de la secuencia codificante se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0083] El término "secuencia de control" como se utiliza aquí se refiere una secuencia de polinucleótidos que es necesaria para efectuar la expresión y procesar las secuencias de codificación a

las que se ligan. La naturaleza de dichas secuencias de control dependiendo del organismo anfitrión en procariotes, dichas secuencias de control incluyen de manera general promotor, sitio de unión ribosómico, y la secuencia de terminación de transcripción en eucariotes, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores y la secuencia de terminación de transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir, a un mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para expresión y procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, las secuencias líderes y las secuencias de sitio de fusión. El término "polinucleótido," como se denomina aquí, se refiere un boro polimérico de nucleótidos de por lo menos 10 bases de longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN de hebra doble y de hebra sencilla.

[0084] El término "oligonucleótido" denominado aquí incluye nucleótidos modificados, y que ocurren en forma natural ligados por enlaces de oligonucleótido que ocurren en forma natural, y que ocurren en forma no natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprende de manera general una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente los oligonucleótidos son 10 a 60 bases de longitud y más preferiblemente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son usualmente de hebra sencilla, por ejemplo, para sondas, aunque los oligonucleótidos pueden ser de hebra doble, por ejemplo, para uso en la

construcción de un mutante de gen. Los oligonucleótidos de la invención son oligonucleótidos codificantes o anticodificantes.

[0085] El término "nucleótidos que ocurren en forma natural" denominados aquí incluyen desoxiribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" denominados aquí incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces de oligonucleótido" denominado aquí incluye enlaces de oligonucleótidos tal como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenioato, fosforodiselenioato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforonmidato, y similares. Véase por ejemplo, LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein et al. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon et al. Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. Patente Estadounidense No. 5, 151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir una parca para detección, si se desea.

[0086] El término "hibrida selectivamente" denominado aquí significa detectablemente y específicamente unido. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención hibridan selectivamente a hebras de ácido nucleico bajo hibridación y condiciones de lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Se pueden utilizar condiciones de alta

exigencia para lograr condiciones de hibridación selectivas como se conoce en la técnica y se discute aquí. De manera general, la homología de secuencia de ácidos nucleicos entre los polinucleótidos, oligonucleótidos, y fragmentos de la invención y una secuencia de ácidos nucleicos de interés será por lo menos 80%, y más típicamente con homologías preferiblemente aumentadas de por lo menos 85%, 90%, 95%, 99%, y 100%. Dos secuencias de aminoácidos son homólogas si existe una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, 85% de homología significa que 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias se alinean para emparejamiento máximo. Se permiten espacios (en cualquiera de las dos secuencias emparejadas) en la maximización de las longitudes de espacio emparejado de 5 o menos que se prefieren con 2 o menos siendo el más preferido. Alternativamente y preferiblemente, dos secuencias de proteína (o secuencias de polipéptidos derivados de ellos de por lo menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, cuando se utiliza aquí este término, si tienen un puntaje de alineación de más de 5 (en unidades de desviación estándar) utilizando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalidad de espacio de 6 o más. Véase Dayhoff, M.O., en Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 101-110 (Volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y Complemento 2 para este volumen, pp. 1-10. Las dos secuencias o partes de las mismas son preferiblemente más homólogas si sus aminoácidos son mayores que o iguales a 50% idéntico cuando se alinea óptimamente utilizando el programa ALIGN. El término "corresponde a" se utiliza aquí para significar que una secuencia de polinucleótidos es homóloga (es decir, es idéntica, no se relaciona estrictamente evolucionada) a toda o

parte de una secuencia de polinucleótido de referencia, o que una secuencia de polipéptido es idéntica a una secuencia de polipéptido de referencia. En contraposición, el término “complementario a” se utiliza para significar que la secuencia complementaria es homóloga a toda o parte de una secuencia de polinucleótido de referencia. Para ilustración, la secuencia de nucleótidos “TATAC” corresponde a una secuencia de referencia “TATAC” y es complementaria a una secuencia de referencia “GTATA”.

10

[0087] Los siguientes términos se utilizan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de polinucleótidos o secuencia de aminoácidos: “secuencia de referencia”, “ventana de comparación”, “identidad de secuencia”, “porcentaje de identidad de secuencia”, e “identidad sustancial”.

15

Una “secuencia de referencia” es una secuencia definida como una base para una comparación de secuencia con una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de un cADN de longitud completa o secuencia de gen dada en un listado de secuencia o puede comprender un cADN completo o secuencia de gen. De manera general, una secuencia de referencia tiene por lo menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos de longitud, frecuentemente por lo menos 24 nucleótidos o 8 aminoácidos de longitud, y frecuentemente por lo menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos de longitud. En razón a que dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos cada uno puede comprender (1) una secuencia (es decir, una parte de la secuencia de polinucleótidos completa o secuencia de aminoácidos) que es similar entre las dos moléculas,

20

25

y (2) puede comprender adicionalmente una secuencia que es divergente entre las dos secuencias de polinucleótidos o secuencia de aminoácidos, las comparaciones de secuencia entre las dos (o más) moléculas se realizan normalmente al comparar 5 secuencias de las dos moléculas sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como se utiliza aquí, se refiere a un segmento conceptual de por lo menos 18 posiciones de nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos en donde 10 una secuencia de polinucleótidos o secuencia de aminoácidos se puede comparar con una secuencia de referencia de por lo menos 18 nucleótidos contiguos o 6 secuencias de aminoácidos y en donde la parte de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones, eliminaciones, 15 sustituciones, y similares (es decir, espacios) de 20 por ciento o menos cuando se compara con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación se puede conducir mediante el 20 algoritmo de homología local de Smith and Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444 (1988), mediante 25 implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks, o Mac Vector software packages), o mediante inspección, y se selecciona la mejor alineación (es

decir, que resulta en el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generado por los diversos métodos.

[0088] El término "identidad de secuencia" significa que dos
5 secuencias de polinucleótidos o aminoácidos son idénticas (es decir, sobre una base nucleótido por nucleótido o residuo por residuo) sobre la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula al comparar dos secuencias óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación,
10 determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) o el residuo ocurre en secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es
15 decir, el tamaño de ventana), y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Los términos "identidad sustancial" como se utiliza aquí denota una característica de un polinucleótido o secuencia de aminoácidos, en donde el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia
20 que tiene por lo menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más usualmente por lo menos 99 por ciento de identidad de secuencia cuando se compara con una secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de por lo menos 18 posiciones de
25 nucleótidos (6 aminoácido), frecuentemente sobre una ventana de por lo menos 24-48 posiciones de nucleótido (8-16 aminoácido), en donde el porcentaje de identidad de secuencia se calcula al comparar la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir eliminaciones o adiciones que el total de 20 por ciento o

menos de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

5 [0089] Como se utiliza aquí, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland⁷ Mass. (1991)). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte
10 aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tal como α -, α - aminoácidos disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4
15 hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetillisina, ϵ -N-acetillisina, O-fosfoserina, N- acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos similares y iminoácidos (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la anotación de polipéptido utilizada aquí,
20 la dirección a mano izquierda es la dirección de terminal amino y la dirección a mano derecha es la dirección de terminal carboxi, de acuerdo con el uso estándar y convención.

[0090] De forma similar, a menos que se especifique de otra
25 forma, el extremo a mano izquierda de las secuencias de polinucleótidos de hebra sencilla es el extremo 5' y la dirección a mano izquierda de las secuencias de polinucleótidos de hebra doble se denomina como la dirección 5'. La dirección de la adición 5' a 3' de los transcritos de ARN naciente se denomina

como la secuencia de dirección de transcripción en la hebra de ADN que tiene la misma secuencia que el ARN y que tienen 5' al extremo 5' del transcripto de ARN se denominan como "secuencias en la dirección 5'", las regiones de secuencia en la hebra de ADN tienen la misma secuencia que el ARN y que tienen 3' al extremo 3' del transcripto de ARN se denominan como "secuencia en la dirección 3'".

[0091] Como se aplica a lo polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que las dos secuencias de péptidos, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT utilizando ponderación de espacio predeterminado, comparten por lo menos 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente por lo menos 95 por ciento de identidad de secuencia, y más preferiblemente por lo menos 99 por ciento de identidad de secuencia.

[0092] Preferiblemente, las posiciones de residuo que no son idénticas difieren sustituciones conservadoras de aminoácido.

[0093] Las sustituciones conservadoras de aminoácido se refieren a la intercambiabilidad de los residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, y isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales hidroxilo alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen

cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, y triptofan; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina, y histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina valina, glutámico- aspártico, y asparagina-glutamina.

10 [0094] Como se discutió anteriormente, se contemplan variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina que se abarcan por la presente invención, dado que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantienen por lo menos 75%, más preferiblemente por 15 lo menos 80%, 90%, 95%, y más preferiblemente 99%. En particular, se contemplan reemplazos conservadores de aminoácido. Los reemplazos conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que se relacionan en sus cadenas laterales. Los aminoácidos genéticamente codificados se dividen 20 generalmente en familias: (1) los aminoácidos ácidos son aspartato, glutamato; (2) los aminoácidos básicos son lisina, arginina, histidina; (3) los aminoácidos no polares son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofan, y (4) los aminoácidos polares no cargados son glicina, 25 asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Los aminoácidos hidrófilos incluyen arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina, y treonina. Los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptofan, tirosina y

valina. Otras familias de aminoácidos incluyen (i) serina y treonina, que son la familia hidroxil alifática; (ii) asparagina y glutamina, que son la familia que contiene amida; (iii) alanina, valina, leucina y isoleucina, que son la familia alifática; y (iv) fenilalanina, triptofan, y tirosina, que son la familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrán un efecto principal sobre la unión o las propiedades de la molécula resultante, especialmente si el reemplazo no implica un aminoácido dentro de un sitio de estructura principal. Su resulta un cambio de aminoácido en un péptido funcional se puede determinar fácilmente al evaluar la actividad específica del derivado de polipéptido. Se describen ensayos en detalle aquí. Los fragmentos o análogos de los anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina se pueden preparar fácilmente por aquellos medianamente versados en la técnica. Los terminales amino y carboxi preferidos de fragmentos o análogos ocurren cerca a los límites de los dominios funcionales. Se pueden identificar los dominios funcionales y estructurales mediante la comparación de los datos de la secuencia de nucleótidos y/o secuencia de aminoácidos con bases de datos de secuencia pública o privada. Preferiblemente, se utilizan métodos de comparación computarizados para identificar los motivos de secuencia o los dominios de conformación de la proteína predicha que ocurren en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Se conocen los métodos para identificar las secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional

conocida. Bowie et al. Science 253: 164 (1991). Sin embargo, los ejemplos anteriores demuestran que aquellos expertos en la técnica pueden reconocer los motivos de secuencia y las conformaciones estructurales que se pueden utilizar para definir los dominios estructurales y funcionales de acuerdo con la invención.

[0095] Las sustituciones de aminoácido preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteína, (4) alterar las afinidades de unión, y (4) conferir o modificar otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos análogos. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia diferente de la secuencia de péptidos que ocurren en forma natural. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácido únicas o múltiples (preferiblemente sustituciones conservadoras de aminoácidos) se pueden hacer en la secuencia que ocurre en forma natural (preferiblemente en la parte del polipéptido fuera de los dominios que forman contactos intermoleculares. Una sustitución conservadora de aminoácido no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia progenitora (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que ocurre en la secuencia progenitora, o interrumpir otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia progenitora). Ejemplos de las estructuras secundarias y terciarias de polipéptido reconocidas en la técnica se describen en Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to

Protein Structure (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton et al. Nature 354: 105 (1991).

5 [0096] El término "fragmento de polipéptido" como se utiliza aquí se refiere a un polipéptido que tiene una eliminación del terminal amino y/o terminal carboxi, pero cuando la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia deducida que ocurre en forma
10 natural, por ejemplo, de una secuencia de cADN de longitud completa. Los fragmentos tienen normalmente por lo menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de largo, preferiblemente por lo menos 14 aminoácidos de largo, más preferiblemente por lo menos 20 aminoácidos de largo, usualmente por lo menos 50 aminoácidos de
15 largo, y incluso más preferiblemente por lo menos 70 aminoácidos de largo. El término "análogo" como se utiliza aquí se refiere a polipéptidos que están comprendidos de un segmento de por lo menos 25 aminoácidos que tiene identidad sustancial a una parte de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene unión
20 específica a CD47, bajo condiciones de unión adecuadas. Normalmente, los análogos de polipéptido comprenden una sustitución conservadora de aminoácido (o adición o eliminación) con respecto a la secuencia que ocurre en forma natural. Los análogos tienen normalmente por lo menos 20 aminoácidos de largo,
25 preferiblemente por lo menos 50 aminoácidos de largo o más, y pueden frecuentemente ser tan largos como un polipéptido que ocurre en forma natural de longitud completa.

[0097] Se utilizan comúnmente análogos de péptido en la industria farmacéutica como fármacos no péptido con propiedades análogas a aquellas del péptido plantilla. Estos tipos de compuesto no péptido se denominan "imitadores de péptido" o "imitadores de péptido". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986), Veber and Freidinger TINS p.392 (1985); y Evans et al. J. Med. Chem. 30: 1229 (1987). Dichos compuestos se desarrollan frecuentemente con la ayuda de modelamiento molecular computarizado. Se pueden utilizar imitadores de péptido que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles para producir un efecto profiláctico o terapéutico equivalente. De manera general, los imitadores de péptido son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológicaa), tal como anticuerpo humano, pero que tienen uno o más enlaces de péptido opcionalmente reemplazados por un enlace que se selecciona del grupo que consiste de:— CH₂NH-, -CH₂S-,— CH₂-CH₂-, -CH=CH-(cis y trans), -COCH₂-, CH(OH)CH₂-, y -CH₂SO-, mediante métodos bien conocidos en la técnica. Se puede utilizar la sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consensus con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de lisina L-lisina) para generar péptidos más estables. Adicionalmente, se pueden generar péptidos limitados que comprenden una secuencia consensus o una variación de secuencia consensus sustancialmente idéntica mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992)); por ejemplo, al agregar residuos de cisteína internos capaces de formar puentes de disulfuro intramolecular que ciclizan el péptido.

[0098] El término "agente" se utiliza aquí para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de materiales biológicos.

[0099] Como se utiliza aquí, los términos "marca" o "marcado" se refiere una incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de unidades estructurales biotínico que se pueden detectar mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar mediante métodos ópticos o calorimétricos). En ciertas situaciones, la marca o marcador también puede ser terapéutico. Se pueden utilizar diversos métodos de marcado de polipéptidos y glucoproteínas que se conocen en la técnica. Ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos lantánido), marcas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, p-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscente, grupos biotínico, epítopos de polipéptido predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencia para cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metal, etiquetas de epítipo). En algunas realizaciones, las marcas se unen por brazos separadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. El término "agente o fármaco farmacéutico" como se

utiliza aquí se refiere a un compuesto o composición química capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente.

5 [00100] El término "agente antineoplásico" se utiliza aquí para referirse a agentes que tienen propiedad funcional de inhibir un desarrollo o evolución de un neoplasma en un humano, particularmente una lesión maligna (cancerosa), tal como un carcinoma, sarcoma, linfoma, o leucemia. La inhibición de
10 metástasis es frecuentemente una propiedad de agentes anti-neoplásicos.

[00101] Se utilizan aquí otros términos de química de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como se ejemplifica por The
15 McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

[00102] Como se utiliza aquí, "sustancialmente puro" significa una especie objeto que es una especie predominante presente (es
20 decir, sobre una molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en donde la especie objeto comprende por lo menos aproximadamente 50 por
ciento (sobre una base molar) de todas las especies
25 macromoleculares presentes.

[00103] De manera general, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más

preferiblemente más de aproximadamente 85%, 90%, 95%, y 99%. Más preferiblemente, las especies objeto se purifican para homogeneidad esencial (no se pueden detectar especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencional) en donde la composición consiste esencialmente de una única especie macromolecular.

Anticuerpos CD47

[00104] Los anticuerpos monoclonales de la invención tienen la capacidad de unirse a CD47, para inhibir la unión de SIRP α a CD47, reducir la señalación mediada por CD47-SIRP α , promover fagocitosis, e inhibir el crecimiento y/o migración de tumores. Se determina la inhibición, por ejemplo, utilizando el ensayo celular descrito aquí en los Ejemplos.

[00105] Los anticuerpos de la invención de ejemplo incluyen el anticuerpo 2A1, la versión quimérica de 2A1, y variantes humanizadas de 2A1. Los anticuerpos de la invención de ejemplo incluyen un anticuerpo que tiene una cadena pesada variable (VH) seleccionada de las SEQ ID NOs: 5-30, y que tiene una cadena liviana variable (VL) seleccionada de las SEQ ID NOs: 31-47. Específicamente, los anticuerpos de ejemplo incluyen aquellos proporcionados en la Tabla 1.

Tabla 1.

Anticuerpo	Cadena pesada variable (VH)	Cadena liviana variable (VL)
2A1	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 31
2A1-xi	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 32

Anticuerpo	Cadena pesada variable (VH)	Cadena liviana variable (VL)
AB2.03	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 33
AB2.05	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 35
AB2.04	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 34
AB2.06	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 36
AB2.07	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 37
AB2.08	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 38
AB2.09	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 39
AB2.13	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 43
AB3.09	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 39
AB6.12	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 42
AB6.13	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 43
AB6.14	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 44
AB6.17	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 47
AB10.13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 43
AB10.14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 44
AB11.05	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 35
AB12.05	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 35
AB15.05	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 35
AB16.05	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 35
AB17.05	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 35
AB22.05	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 35
AB23.05	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 35
AB24.05	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 35
AB25.05	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 35

[00106] También se incluyen en la invención son anticuerpos que se unen al mismo epítopo como los anticuerpos CD47 descritos aquí. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se unen especialmente a un epítopo que inhibe uno o más residuos de aminoácidos en CD47 humano (*véase por ejemplo*, Acceso GenBank No. Q08722.1).

[00107] Se proporciona adelante la secuencia de aminoácidos de un CD47 humano de ejemplo (Acceso GenBank No. Q08722.1 (GI:1171879), incorporada aquí mediante referencia). Se subraya la secuencia de señal (aminoácidos 1-18).

```

1  mwplvaalll gsaccgsaql lfnktsvef tfcndtvvip cfvtmneaqn
ttevvyvkwkf
61  kgrdiytfdg alnkstvptd fssakievsg llkgdaslkm dksdavshg
nytcevtelt
121 regetiiek yrvvswfspn enilivifpi faillfwgqf giktlkyrsg
gmdektiall
181 vaglvitviv ivgailfvpg eyslknatgl glivtstgil illhyyvfst
aigltsfvia
241 ilviqviayi lavvglsici aacipmhgpl lisglslal aqllglvymk
fvasnqktiq
301 pprkaveep1 nafkeskgmm nde (SEQ ID NO: 48)

```

5

[00108] Para claridad, se proporciona adelante la secuencia de aminoácidos de un CD47 humano de ejemplo que excluye la secuencia de señal.

```

1  qllfnktskv eftfcndtvv ipcfvtmnea qnttevvykw kfkgrdiytf
dgalnkstvp
61  tdfssakiev sqllkgdasl kmdksdavsh tgnytcevtel tregetiie
lkyrvvswfs
121 pnenilivif pifaillfwg qfgiktlkyr sggmdektia llvaglvitv
ivivqailfv
181 pgeyslknat glglivtstg ilillhyyvfst aigltsfv iailviqv
yilavvglsil
241 ciaacipmhg pllisglsl alaqlglvly mkfvasnqkt iqpprkavee
plnafkeskg
301 mmnde (SEQ ID NO: 147)

```

10

[00109] Se proporciona adelante secuencia de aminoácidos de un dominio de IgV humano CD47 de ejemplo:

```

19  qllfnktskv eftfcndtvv ipcfvtmnea qnttevvykw kfkgrdiytf
dgalnkstvp
79  tdfssakiev sqllkgdasl kmdksdavsh tgnytcevtel tregetiie lkyrvv
(SEQ ID NO: 49)

```

15

[00110] Los anticuerpos monoclonales de ejemplo de la invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanizados que tienen una región de cadena pesada variable (VH) y/o región de cadena liviana variable (VL) mostrada en las secuencias adelante.

20

[00111] Se proporcionan regiones de cadena pesada variable (VH) de los anticuerpos CD47 adelante. Las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de la cadena VH de los anticuerpos CD47 se destacan adelante. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de CDR1 de VH es GFNIKDYLLH (SEQ ID NO: 50), GYTFTYYLLH (SEQ ID NO: 57), GFTFTYYLLH (SEQ ID NO: 58), GYNFTYYLLH (SEQ ID NO: 59), GYTITYYYLLH (SEQ ID NO: 60), GYTFTKYYLLH (SEQ ID NO: 61), GYTFTDYLLH (SEQ ID NO: 62), 10 GFTFTDYLLH (SEQ ID NO: 63), GFTITDYLLH (SEQ ID NO: 64), GYTFTKDYLLH (SEQ ID NO: 65), o GFTFTKDYLLH (SEQ ID NO: 66). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de VH es WIDPDNGDTE (SEQ ID NO: 51), WIDPDQGDTE (SEQ ID NO: 72), WIDPDYGDTE (SEQ ID NO: 73), WIDPDSGDTE (SEQ ID NO: 74), 15 WIDPDNADTE (SEQ ID NO: 75), o WIDPDNTDTE (SEQ ID NO: 76). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de VH es NAAYGSSSYPM DY (SEQ ID NO: 52) o NAAYGSSPYPM DY (SEQ ID NO: 77).

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPDNGDTEFAPKFGKATMTADT
SSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGTSVTV (SEQ ID NO: 5)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIDYLLHWVQAPGKGLEWMGWIDPDNGDTEYAEKFQGRVTITADT
STDTAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGITVTV (SEQ ID NO: 6)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGITVTV (SEQ ID NO: 7)

EVQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGITVTV (SEQ ID NO: 8)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQGRVTMTADT
SSNTAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSYPM DYWGQGITVTV (SEQ ID NO: 9)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQGRVTMTEDT
 SMTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 10)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 11)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDYGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 12)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDSGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 13)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNADTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 14)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNIDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 15)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 16)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTFIYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 17)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTFIYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 18)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYNFIYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 19)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTITYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 20)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTFKYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 21)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTFIDYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 22)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTFIDYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 23)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTITDYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 24)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTFKDYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 25)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGYTFKDYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 26)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYLQLSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 27)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLTSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 28)

EVOLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIDYYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAOKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 29)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIDYYLLHWVQAPGKGLEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVITTRDR
 SMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGITTVTV (SEQ ID NO: 30)

[00112] Se proporcionan las regiones de cadena liviana variable
 5 (VL) de los anticuerpos CD47. Las CDR de la cadena VL de los anticuerpos CD47 se resaltan adelante. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de CDR1 de VL es KASQDIHRYLS (SEQ ID

NO: 53), RASQDIHRYLA (SEQ ID NO: 67), o RARQGIHRYLS (SEQ ID NO: 68). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de VL es RANRLVD (SEQ ID NO: 54), RANRLQS (SEQ ID NO: 69), RANRRAT (SEQ ID NO: 70), o RANRLVS (SEQ ID NO: 71). En algunas 5 realizaciones, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de VL es LQYDEFPYT (SEQ ID NO: 55).

DIKMTQSPSSLYASLGERTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKSPKILYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLT
ISSLEYEDMGIIYCLQYDEFPYTFGGGTKLEMK (SEQ ID NO: 31)

DIKMTQSPSSLYASLGERTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKSPKILYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLT
ISSLEYEDMGIIYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 32)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWYQQKPGKAPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTFT
ISSLPEDIATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 33)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 34)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 35)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWYQQKPGKAPKRLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 36)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLAWYQQKPGKVPKLLIYRANRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLPEDVATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 37)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHRYLAWYQQKPGQAPRLIYRANRRATGIPARFSGSGSGTDFTLT
ISSLEPEDFAVYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 38)

DIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 39)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 40)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKILYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 41)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 42)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKILYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 43)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 44)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 45)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 46)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 47)

10 [00113] En algunos casos, los anticuerpos CD47 descritos aquí comprenden una región de cadena pesada variable seleccionada de

SEQ ID NOs: 5-30 y una región de cadena ligera variable seleccionada de SEQ ID NOs: 31-47. Un anticuerpo CD47 de ejemplo comprende una región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 5 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 31; una región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 7 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 35; una región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 11 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 42, una región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 5 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 32, una región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 7 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 33, una región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 7 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 34, una región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 7 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 36, una región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 7 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 37, una región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 7 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 38, una región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 29 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 35, una región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 30 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 35, una región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 7 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 43, una

región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 11
 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID
 NO: 43, una región de cadena pesada variable establecida en la
 SEQ ID NO: 11 y una región de cadena ligera variable establecida
 5 en la SEQ ID NO: 47, una región de cadena pesada variable
 establecida en la SEQ ID NO: 15 y una región de cadena ligera
 variable establecida en la SEQ ID NO: 43, una región de cadena
 pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 15 y una región de
 cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 44, una
 10 región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 11
 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID
 NO: 44, una región de cadena pesada variable establecida en la
 SEQ ID NO: 22 y una región de cadena ligera variable establecida
 en la SEQ ID NO: 35, una región de cadena pesada variable
 15 establecida en la SEQ ID NO: 7 y una región de cadena ligera
 variable establecida en la SEQ ID NO: 39, una región de cadena
 pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 8 y una región de
 cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 39, una
 región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 16
 20 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID
 NO: 35, una región de cadena pesada variable establecida en la
 SEQ ID NO: 20 y una región de cadena ligera variable establecida
 en la SEQ ID NO: 35, una región de cadena pesada variable
 establecida en la SEQ ID NO: 21 y una región de cadena ligera
 25 variable establecida en la SEQ ID NO: 35, una región de cadena
 pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 17 y una región de
 cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 35, una
 región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 28
 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID

NO: 35, o una región de cadena pesada variable establecida en la SEQ ID NO: 27 y una región de cadena ligera variable establecida en la SEQ ID NO: 35.

5 [00114] Los anticuerpos CD47 descritos aquí comprenden una cualquiera de las regiones VH proporcionadas en la SEQ ID NOs: 5-30 pareadas con una cualquiera de las regiones VL proporcionadas en las SEQ ID NOs: 31-47. Específicamente, los anticuerpos CD47 descritos aquí comprenden una cualquiera de las regiones VH
10 proporcionadas en las SEQ ID NOs: 5, 7, 8, 11, 15-17, 20-22, y 27-30 pareadas con una cualquiera de las regiones VL proporcionadas en las SEQ ID NOs: 31-39, 42, 43, 44, y 47.

[00115] Los anticuerpos CD47 descritos aquí comprenden una
15 cualquiera de las regiones CDR1 de VH proporcionadas en la SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, y SEQ ID NO: 66, una cualquiera de las regiones de CDR2 de VH proporcionada en la SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 72, SEQ
20 ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, y SEQ ID NO: 76, una cualquiera de las regiones CDR3 de VH proporcionadas en la SEQ ID NO: 52 y SEQ ID NO: 77, una cualquiera de las regiones CDR1 de VL de proporcionadas en la SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67, y SEQ ID NO: 68, una cualquiera de las de regiones CDR2 de VL
25 proporcionadas en la SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, y SEQ ID NO: 71, y la región de CDR3 de VL proporcionada en la SEQ ID NO: 55.

[00116] Aquellos expertos en la técnica reconocerán que es posible determinar, sin la experimentación indebida, si un anticuerpo monoclonal tiene la misma especificidad que un anticuerpo monoclonal de la invención (*por ejemplo*, el anticuerpo 2A1, o un anticuerpo que tiene una cadena variable pesada seleccionada de la SEQ ID NO: 5-31, y una cadena ligera variable seleccionada entre la SEQ ID NO: 31-47) al determinar si el primero impide el último de la unión a CD47. Si el anticuerpo monoclonal que se prueba compite con el anticuerpo monoclonal de la invención, como se muestra por una disminución en la unión por el anticuerpo monoclonal de la invención, luego los dos anticuerpos monoclonales se unen a los mismos, o un epítipo estrechamente relacionado.

[00117] Un método alternativo para determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la especificidad de anticuerpo monoclonal de la invención es pre-incubar el anticuerpo monoclonal de la invención con la proteína CD47 soluble (con la que es normalmente reactiva) y luego se agrega el anticuerpo monoclonal anticuerpo que se prueba para determinar si el anticuerpo monoclonal a probar se inhibe en su capacidad para unirse a CD47. Si se inhibe el anticuerpo monoclonal que luego se va a aprobar, con toda probabilidad, tiene la misma, o funcionalmente equivalente, especificidad epitópica que el anticuerpo monoclonal de la invención.

Anticuerpos de la Presente Invención

[00118] La detección de los anticuerpos monoclonales de la invención, también se puede llevar a cabo, *por ejemplo*, al medir

señalización mediada por CD47-y/o de CD47/SIRP α , y determinar si el anticuerpo monoclonal de ensayo es capaz de modular, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar, neutralizar o de otro modo interferir con señalización mediada por CD47-y/o de CD47/SIRP α .

5 Estos ensayos pueden incluir ensayos de unión competitiva. Adicionalmente, estos ensayos pueden medir una lectura biológica, por ejemplo la capacidad de promover la fagocitosis de una célula que expresa CD47 por un macrófago, como se describe en el Ejemplo 9 (Figura 9).

10

[00119] Se pueden utilizar diversos procedimientos conocidos dentro de la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD47, o contra derivados, fragmentos, análogos de homólogos u ortólogos de los mismos.

15 (Véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, incorporado aquí mediante referencia). Los

anticuerpos completamente humanos son moléculas de anticuerpo en el que la secuencia completa de la cadena ligera y la cadena pesada, que incluyen las CDR, surgen a partir de genes humanos.

20 Dichos anticuerpos se denominan aquí “anticuerpos humanos” o “anticuerpos completamente humanos”. Los anticuerpos monoclonales

humanos se preparan, por ejemplo, utilizando los procedimientos descritos en los Ejemplos proporcionados adelante. Los

25 anticuerpos monoclonales humanos también se pueden preparar al utilizar la técnica del trioma; la técnica de hibridoma de células B humanas (véase Kozbor, et al, 1983 *Immunol Today* 4: 72); y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, et al, 1985 En: MONOCLONAL

ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden utilizar y se pueden producir al utilizar hibridomas humanos (véase Cote, et al., 1983 Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) o al transformar
 5 células B humanas con virus de Epstein Barr *in vitro* (véase Cole, et al, 1985 En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

[00120] Los anticuerpos se purifican mediante técnicas bien
 10 conocidas, tales como cromatografía de afinidad utilizando proteína A o proteína G, que proporcionan principalmente la fracción IgG del suero inmunológico. Posteriormente, o alternativamente, el antígeno específico que es el objetivo de la inmunoglobulina buscado, o un epítipo del mismo, se puede
 15 inmovilizar sobre una columna para purificar el anticuerpo específico inmune mediante cromatografía de inmunoafinidad. Se discute purificación de inmunoglobulinas, por ejemplo, por D. Wilkinson (The Scientist, publicado por The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (17 de abril de 2000), pp. 25-
 20 28).

[00121] Los anticuerpos de CD47 de la invención son anticuerpos monoclonales. Se generan anticuerpos monoclonales que modulan, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o de otro
 25 modo interfieren con señalización celular mediada por CD47 y/o CD47/SIRP α , *por ejemplo*, al inmunizar un animal con membrana de CD47 unida y/o soluble, tal como, por ejemplo, CD47 humano o un fragmento inmunogénico, derivado o variante del mismo. Alternativamente, el animal se inmuniza con células transfectadas

con un vector que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica CD47 de tal manera que CD47 se expresa y se asocia con la superficie de las células transfectadas. Alternativamente, los anticuerpos se obtienen al detectar una colección que contiene 5 secuencias de dominio de unión a anticuerpo o antígeno para unión a CD47. Se prepara esta colección, *por ejemplo*, en el bacteriófago como proteínas o péptidos de fusión con una proteína de cubierta del bacteriófago que se expresa en la superficie de partículas de fagos ensamblados y las secuencias de ADN de 10 codificación contenidas dentro de las partículas de fago (es decir, "colección que exhibe fago"). Los hibridomas resultantes de fusiones de células B/ mieloma luego se detectan para reactividad a CD47.

15 [00122] Se preparan anticuerpos monoclonales, *por ejemplo*, utilizando métodos de hibridoma, tales como aquellos descritos por Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal anfitrión apropiado, normalmente se inmuniza con un agente inmunizante para obtener 20 linfocitos que producen o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, se pueden inmunizar los linfocitos *in vitro*.

[00123] El agente inmunizante incluirá normalmente el antígeno de 25 la proteína, un fragmento de la misma o una proteína de fusión de la misma. Generalmente, se utilizan ya sea linfocitos de sangre periférica si se desean células de origen humano, o células de bazo o células de ganglios linfáticos se utilizan si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos luego se fusionan

con una estirpe celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp 59-103). Las estirpes

5 celulares inmortalizadas son normalmente células de mamífero transformadas, particularmente las células de mieloma de roedor, bovino y humano. Usualmente, se emplean estirpes celulares de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que contiene

10 preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá

15 hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

[00124] Las estirpes celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan expresión de

20 alto nivel estable de anticuerpo mediante la producción las células que producen anticuerpos seleccionados, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las estirpes celulares inmortalizadas más preferidas son estirpes de de mieloma de murino, que se pueden obtener, por ejemplo, desde el Salk

25 Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las estirpes celulares de mieloma y heteromieloma de ratón humanas también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales. (Véase, Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984);

Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63)).

[00125] El medio de cultivo en el que se cultivan las células de
5 hibridoma luego se pueden ensayar para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in*
10 *vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal, por ejemplo, se puede determinar mediante el análisis Scatchard of Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980). Más aún, en
15 las aplicaciones terapéuticas de anticuerpos monoclonales, es importante identificar anticuerpos que tienen un alto grado de especificidad y una alta afinidad de unión por el antígeno objetivo.

20 [00126] Después se identifican las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar al limitar los procedimientos de dilución y crecimiento mediante métodos estándar. (Véase, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Los medios de cultivo adecuados para este
25 propósito incluyen, por ejemplo, Medio Eagle Modificado de Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como ascitis en un mamífero.

[00127] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar a partir del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

[00128] Los anticuerpos monoclonales también se pueden hacer mediante métodos de ADN recombinante, tales como aquellos descritos en la Patente Estadounidense No. 4,816,567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden aislar fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales (*por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos*). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que luego se transfectan en células anfitrionas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células 293 de riñón embriónico humano (HEK), células COS de simio, células NS0, PER.C6®, células NS0, SP2/0, YB2/0, o células de mieloma que de otra forma no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células anfitrionas recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, al sustituir la secuencia codificante de los dominios constantes humanos de cadena pesada y ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas (véase Patente Estadounidense No. 4,816,567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) o al unirse covalentemente a

la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido sin inmunoglobulina. Dicho polipéptido sin inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o se puede sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Anticuerpos Humanos y Humanización de Anticuerpos

[00129] Los anticuerpos monoclonales de la invención incluyen anticuerpos totalmente humanos o anticuerpos humanizados. Estos anticuerpos son adecuados para administración a humanos sin engendrar una respuesta inmune por el humano contra la inmunoglobulina administrada.

[00130] Se genera un anticuerpo CD47, por ejemplo, utilizando los procedimientos descritos en los ejemplos proporcionados adelante. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención se identifican utilizando un RIMMS modificado (Múltiples Sitios de Repetitivo Inmunización) de la estrategia de inmunización en ratones y generación de hibridomas posterior.

[00131] En otros métodos, alternativos, un anticuerpo CD47 se desarrolla, por ejemplo, utilizando métodos de presentación en fagos utilizando anticuerpos que contienen sólo las secuencias humanas. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica, *por ejemplo*, en la W092/01047 y la Patente Estadounidense No. 6,521,404, que se incorporan aquí mediante referencia. En este método, una colección combinatoria de fagos lleva pares

aleatorios de cadenas ligeras y pesadas se examinan utilizando fuente natural o recombinante de CD47 o fragmentos de los mismos. En otro método, un anticuerpo CD47 se puede producir por un proceso en donde por lo menos una etapa del proceso incluye 5 inmunizar un animal transgénico, no humano con la proteína CD47 humana. En este método, algunos de los loci endógenos de cadena ligera y/o pesada kappa de este animal no humano xenogénico se han deshabilitado y son incapaces de la reordenación requerida para generar genes que codifican inmunoglobulinas en respuesta a 10 un antígeno. Adicionalmente, por lo menos un locus de cadena pesada humana y por lo menos un locus de cadena ligera humana se han transfectado de forma estable en el animal. Por lo tanto, en respuesta a un antígeno administrado, los locus humanos se reordenan para proporcionar genes que codifican regiones 15 variables humanas inmunes específicas para el antígeno. Luego de inmunización, por lo tanto, el XenoMouse® produce células B que secretan las inmunoglobulinas completamente humanas.

[00132] Una variedad de técnicas son bien conocidas en la técnica 20 para la producción de animales no humanos xenogénicos. Por ejemplo, véase Patente Estadounidense No. 6,075,181 y No. 6,150,584, que se incorpora aquí mediante referencia en su totalidad. Esta estrategia general se demuestra en relación con la generación de las primeras cepas de XenoMouse™, publicada en 25 1994. Véase Green *et al.* Nature Genetics 7: 13-21 (1994), que se incorpora aquí mediante referencia en su totalidad. Véase también, Patente Estadounidense Nos. 6, 162,963; 6,150,584; 6,114,598; 6,075,181; y 5,939,598 y las Patentes Japonesas Nos. 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2 y la Patente Europea No.

EP 0 463 151 B1 y Solicitudes de Patente Internacional No. WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 y miembros de la familia relacionados.

5 [00133] En un método alternativo, otros han utilizado un método de "minilocus" en el que un locus de Ig exógeno es imitado por medio de la inclusión de piezas (genes individuales) del locus de Ig. Por lo tanto, uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu, y una segunda región
 10 constante (preferiblemente una región constante gamma) se forman en una construcción para inserción en un animal. Véase, *por ejemplo*, Patentes Estadounidenses Nos. Nos. 5,545,806; 5,545,807; 5,591,669; 5,612,205; 5,625,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,643,763; 5,661,016; 5,721,367; 5,770,429; 5,789,215; 5,789,650; 5,814,318;
 15 5,877; 397; 5,874,299; 6,023,010; y 6,255,458; y en la Patente Europea No. 0 546 073 B1; y Solicitudes de Patente Internacional Nos. WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 y WO 98/24884 y miembros de la familia relacionados.

20

[00134] La generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los que, a través de la fusión de microcélulas, se han introducido grandes piezas de cromosomas, o cromosomas enteros, también se ha demostrado. Véase Solicitud de Patente Europea Nos.
 25 773 288 y 843 961.

[00135] Las respuestas de anticuerpo de anti-ratón humanas (HAMA) han llevado a la industria a preparar anticuerpos quiméricos o de otra forma humanizados. Mientras que los anticuerpos quiméricos

tienen una región constante humana y una región variable inmune, se espera que se observen ciertas respuestas de anticuerpo anti-quimérico (HACA) respuestas, particularmente en utilizaciones crónicas o de múltiples dosis del anticuerpo. Por lo tanto, sería deseable proporcionar anticuerpos totalmente humanos contra CD47 con el fin de viciar o de otra forma mitigar las preocupaciones y/o efectos de respuesta de HAMA o HACA.

[00136] La producción de anticuerpos con inmunogenicidad reducida también se realiza a través de técnicas de humanización, quimerización y visualización utilizando colecciones apropiadas. Se apreciará que los anticuerpos de murino o anticuerpos de otras especies se pueden humanizar o primatizar utilizando técnicas bien conocidas en el arte. Véase, *por ejemplo*, Winter and Harris Immunol Today 14:43 46 (1993) y Wright et al. Crit, Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992). El anticuerpo de interés se puede diseñar por ingeniería mediante técnicas de ADN recombinante para sustituir la CH1, CH2, CH3, los dominios de bisagra, y/o el dominio de estructura con la secuencia humana correspondiente (Véase documento WO 92/02190 y Patente Estadounidense No. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,792; 5,714,350; y 5,777,085). También, el uso de ADNc de Ig para la construcción de genes de inmunoglobulina quiméricos se conoce en la técnica (Liu et al. P.N.A.S. 84:3439 (1987) y J. Immunol. 139:3521 (1987)). El ARNm se aísla a partir de un hibridoma u otra célula que produce el anticuerpo y se utiliza para producir ADNc. El ADNc de interés se puede amplificar mediante la reacción en cadena de polimerasa utilizando cebadores específicos (Patentes Estadounidenses Nos. 4,683,195 y 4,683,202). Alternativamente, una colección se hace y

se detecta para aislar la secuencia de interés. La secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo luego se fusiona a las secuencias de la región constante humana. Las secuencias de genes de regiones constantes humanas se pueden encontrar en Kabat *et al.* (1991) Secuencias de proteínas de interés inmunológico, publicación N.I.H. 91-3242. Los genes de región C humana están disponibles fácilmente a partir de clones conocidos. La elección del isotipo se guiará por las funciones efectoras deseadas, tales como fijación del complemento, o actividad en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Los isotipos preferidos son IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Se puede utilizar cualquiera de las regiones constantes de cadena ligera humana, kappa o lambda. El anticuerpo humanizado quimérico luego se expresa, mediante métodos convencionales.

15

[00137] Los fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, F(ab')₂ y Fab se pueden preparar mediante división de la proteína intacta, por ejemplo, mediante proteasa o división química. Alternativamente, se diseña un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción del fragmento F(ab')₂ incluiría secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguido por un codón de detección de traducción para producir la molécula truncada.

25

[00138] Las secuencias consenso de las regiones H y L_J se pueden utilizar para diseñar oligonucleótidos para uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para el enlace posterior de segmentos de la región V a segmentos de región C humana. El ADNc de región C se puede modificar mediante

mutagenia dirigida a sitio para colocar un sitio de restricción en la posición análoga en la secuencia humana.

[00139] Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, YAC, episomas derivados de EBV, y similares. Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados diseñados con el fin de que cualquier secuencia de VH o VL se pueda insertar y expresar fácilmente. En dichos vectores, el empalme ocurre generalmente entre el sitio de empalme de donantes en la región J insertada y el sitio aceptor de empalme que precede a la región C humana, y también en las regiones de empalme que se producen dentro de los exones CH humanos. La poliadenilación y terminación de la transcripción se producen en sitios cromosómicos naturales en la dirección 3' de las regiones codificantes. El anticuerpo quimérico resultante se puede unir a cualquier promotor fuerte, que incluye LTR retrovíricos, por ejemplo, promotor temprano SV-40, (Okayama *et al.* Mol. Cell. Bio. 3:280 (1983)), virus del sarcoma de Rous LTR (Gorman *et al.* P.N.A.S. 79:6777 (1982)), y virus de leucemia de murino de Moloney LTR (Grosschedl *et al.* Cell 41: 885 (1985)). También, como se apreciará, se pueden utilizar promotores nativos de Ig y similares.

[00140] Adicionalmente, los anticuerpos humanos o anticuerpos de otras especies se pueden generar a través de tecnologías del tipo de visualización, que incluyen, sin limitación, presentación en fagos, visualización retrovímica, visualización ribosómica, y otras técnicas, que utilizan técnicas bien conocidas en el arte y

las moléculas resultantes se pueden someter a maduración adicional, tal como maduración de afinidad, ya que dichas técnicas son bien conocidas en el arte. Wright *et al.* Crit, Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992), Hanes and Pluckthun PNAS USA 94:4937-4942 (1997) (exhibición ribosómica), Parmley and Smith Gene 73:305-318 (1988) (visualización de fago), Scott, TIBS, vol. 17:241-245 (1992), Cwirla *et al.* PNAS USA 87:6378-6382 (1990), Russel *et al.* Nucl. Acids Research 21:1081-1085 (1993), Hoganboom *et al.* Immunol. Reviews 130:43-68 (1992), Chiswell and McCafferty TIBTECH; 10:80-8A (1992), y Patente Estadounidense No. 5,733,743. Si se utilizan tecnologías de visualización para producir anticuerpos que no son humanos, dichos anticuerpos se pueden humanizar tal como se describió anteriormente.

[00141] El uso de estas técnicas, puede generar anticuerpos a células que expresan CD47, formas solubles de CD47, epítomos o péptidos de los mismos, y colecciones de expresión de los mismos (véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,703,057), que después se pueden detectar como se describió anteriormente para la actividades descritas aquí.

[00142] Los anticuerpos de CD47 de la invención se pueden expresar por un vector que contiene un segmento de ADN que codifica el anticuerpo de cadena sencilla descrito anteriormente.

25

[00143] Estos pueden incluir vectores, liposomas, ADN desnudo, ADN asistido por adyuvante, pistola de genes, catéteres, etc. los vectores incluyen conjugados químicos tales como los descritos en el documento WO 93/64701, que tiene una unidad estructural

objetivo (*por ejemplo*, un ligando a un receptor de superficie celular), y una unidad estructura de unión de ácido nucleico (por ejemplo, polilisina), vector viral (por ejemplo, un vector viral de ADN o ARN), proteínas de fusión tales como las descritos en la PCT/US95/02140 (documento WO 95/22618), que es una proteína de fusión que contiene una unidad estructural objetivo (*por ejemplo*, un anticuerpo específico para una célula objetivo) y una unidad estructural de unión ácido nucleico (*por ejemplo*, una protamina), plásmidos, fagos, etc. Los vectores pueden ser cromosómicos, no cromosómicos o sintéticos.

[00144] Los vectores preferidos incluyen vectores víricos, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovíricos incluyen virus de leucemia de murino de Moloney. Se prefieren los vectores víricos de ADN. Estos vectores incluyen vectores de poxvirus, tales como vectores ortopox o de viruela aviar, vectores de virus de herpes tales como un virus de herpes simplex I (HSV) vector (véase Geller, A. I. et al., J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F., et al., in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. et al., Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993); Geller, A. I., et al., Proc Natl. Acad. Sci USA 87: 1149 (1990), Vectores de Adenovirus (véase LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., Nat. Genet 3:219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69:2004 (1995) y Vectores de Virus Asociados a Adeno (véase Kaplitt, M. G., et al., Nat. Genet. 8: 148 (1994).

[00145] Los vectores virales Pox introducen el gen en el citoplasma de células. Los vectores de virus de la viruela aviar resultan en sólo una expresión a corto plazo del ácido nucleico. Los vectores de adenovirus, vectores de virus adeno-asociados y 5 vectores de virus del herpes simple (VHS) se prefieren para introducir el ácido nucleico en células neuronales. Los resultados de vectores de adenovirus en una expresión más a corto plazo (alrededor de 2 meses) que el virus adeno-asociado (alrededor de 4 meses), que a su vez es más corto que los 10 vectores de HSV. El vector particular elegido dependerá de la célula objetivo y la condición que se va a tratar. La introducción puede ser mediante técnicas estándar, *por ejemplo*, infección, transfección, transducción o transformación. Ejemplos de modos de transferencia de genes incluyen, por ejemplo, ADN 15 desnudo, precipitación de CaPO_4 , dextrano DEAE, electroporación, fusión de protoplastos, lipofección, microinyección de células, y vectores víricos.

[00146] Se puede emplear el vector para orientar esencialmente 20 cualquier célula objetivo deseada. Por ejemplo, se puede utilizar inyección estereotáxica para dirigir los vectores (*por ejemplo* adenovirus, HSV) a una ubicación deseada. Adicionalmente, las partículas se pueden entregar por infusión intracerebroventricular (icv), utilizando un sistema de infusión 25 de minibomba, tal como un Sistema de Infusión SynchroMed. Un método con base en flujo a granel, denominado convección, también ha demostrado ser eficaz en la entrega de grandes moléculas a áreas extensas del cerebro y puede ser útil en el suministro del vector a la célula objetivo. (Véase Bobo et al., Proc Natl Acad

Sci. USA 91:2076-2080 (1994); Morrison et al, Am. J. Physiol 266:292-305 (1994)). Otros métodos que se pueden utilizar incluyen catéteres, inyección intravenosa, parenteral, intraperitoneal y subcutánea, y orales u otras rutas conocidas de administración.

[00147] Estos vectores se pueden utilizar para expresar grandes cantidades de anticuerpos que se pueden utilizar en una variedad de formas. Por ejemplo, para detectar la presencia de CD47 en una muestra. El anticuerpo también se puede utilizar para tratar de unirse a e interrumpir la interacción de CD47 y/o CD47/SIRP α y señalización mediada po CD47/SIRP α .

[00148] Se pueden adaptar técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos para una proteína antigénica de la invención (véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,946,778). Adicionalmente, los métodos se pueden adaptar para la construcción de colecciones de expresión de Fab (véase por ejemplo, Huse, et al, 1989 Science 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y efectiva de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para una proteína o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Los fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos para un antígeno de proteína se pueden producir por técnicas conocidas en el arte, que incluyen, pero no se limitan a: (i) un fragmento de F(ab')₂ producido mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento Fab generado al reducir los puentes de disulfuro de un fragmento F_(ab')₂; (iii) un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula de

anticuerpo con papaína y un agente de reducción y (iv) fragmentos Fv.

[00149] La invención también incluye fragmentos F_v, Fab, Fab' y F(ab')₂, fragmentos CD47, anticuerpos CD47 de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único (*por ejemplo*, nanocuerpos o VHH), anticuerpos CD47 biespecíficos, y anticuerpos CD47 heteroconjugados.

[00150] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para por lo menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para CD47. El segundo objetivo de unión es cualquier otro antígeno, y ventajosamente es una proteína de superficie celular o receptor o subunidad de receptor.

[00151] Los métodos para elaborar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena liviana de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se logra usualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicada

el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

[00152] Los dominios variables de anticuerpos con las
5 especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones de bisagra, regiones
10 CH2, y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de
15 inmunoglobulina, se inserta en vectores de expresión separados y se co-transfectan en un organismo anfitrión adecuado. Para detalles adicionales para generar anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

20

[00153] de acuerdo con otro método descrito en el documento W0 96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo se puede diseñar por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células
25 recombinantes. La interfaz preferida comprende por lo menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (*por ejemplo* tirosina o

triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena lateral grande se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo al reemplazar las cadenas laterales grandes de aminoácidos con otras más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

[00154] Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo*, $F(ab')_2$ de anticuerpos biespecíficos). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan et al., Science 229:81 (1985) describen un procedimiento en donde los anticuerpos intactos se dividen proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia de agente complejante de ditiol de arsenito de sodio, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados luego se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab' -TNB luego se convierten de nuevo en Fab' -tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[00155] Adicionalmente, los fragmentos Fab' se pueden recuperar directamente de E. coli y acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secreta por separado de E. coli y se somete a un acoplamiento químico dirigido in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera es capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra objetivos de tumores de mama humanos.

[00156] También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol. 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligan a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se reducen en la región de bisagra para formar monómeros y luego volver a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. También se puede utilizar este método para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio

variable de cadena ligera (V_L) mediante un ligador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. de acuerdo con lo anterior, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv (sFv) de cadena única. Véase, Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994).

10

[00157] Se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

15

[00158] Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítomos diferentes, por lo menos uno de los cuales se origina en el antígeno de proteína de la invención. Alternativamente, un brazo anti-antigénico de una molécula de inmunoglobulina se puede combinar con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula del receptor de células T (*por ejemplo*, CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores Fc para IgG ($Fc\gamma R$), tales como $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RII$ (CD32) y $Fc\gamma RIII$ (CD 16) para enfocar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el antígeno particular. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante radionúclido, tal como EOTUBE, DTPA, DOTA, o TETA. Otro

20

25

anticuerpo biespecífico de interés se une al antígeno de proteína aquí y además se une al factor de tejido (TF).

[00159] Los anticuerpos heteroconjugados están también dentro del
5 alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se han propuesto, por ejemplo, dichos anticuerpos para objetivar células del sistema inmune a células no deseadas (véase Patente Estadounidense No. 4,676,980), y para el
10 tratamiento de infección por VIH (véase WO 91/00360, WO 92/200373; EP 03089). Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* utilizando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, que incluyen aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden
15 construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace de tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y aquellos descritos, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 4,676,980.

20

[00160] Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, con el fin de mejorar, *por ejemplo*, la eficacia del anticuerpo en el
tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la
25 señalización de CD47 aberrante. Por ejemplo, se pueden introducir residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces de disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede haber mejorado la capacidad de internalización y/o aumento de muerte celular

mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). (Véase Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol, 148: 2918-2922 (1992)). Alternativamente, se puede diseñar un por ingeniería un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y de ese modo se puede haber mejorado la lisis de complemento y las capacidades de ADCC. (Véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

[00161] La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como una toxina (*por ejemplo*, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radioactivo (*es decir*, un radioconjugado).

[00162] Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas americana *Phytolaca* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidores de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Una variedad de los radionucleidos está disponible para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

[00163] Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se hacen utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados
 5 bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoyl) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-
 10 diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-
 15 metildietilen triaminopentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. (Véase W094/11026).

[00164] Aquellos medianamente versados en la técnica reconocerán
 20 que una gran variedad de posibles restos se pueden acoplar a los anticuerpos resultantes de la invención. (Véase, *por ejemplo*, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. ruse y R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), cuyos contenidos se incorporan aquí mediante
 25 referencia).

[00165] El acoplamiento se puede realizar por cualquier reacción química que se unirá a las dos moléculas, siempre que el anticuerpo y la otra porción conserven sus respectivas

actividades. Este enlace puede incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo, unión covalente, unión por afinidad, intercalación, unión coordinada y formación de complejos. La unión preferida es, sin embargo, la unión covalente. La unión covalente se puede lograr ya sea por condensación directa de cadenas laterales existentes o mediante la incorporación de moléculas de puente externas. Muchos agentes de enlace bivalentes o polivalentes son útiles en las moléculas de proteína de acoplamiento, tales como los anticuerpos de la presente invención, a otras moléculas. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehído, diazobenzenes y diaminas de hexametileno. Esta lista no pretende ser exhaustiva de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la técnica, sino, más bien, es ejemplo de los agentes de acoplamiento más comunes. (Véase Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133: 1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62: 185-216 (1982); y Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987).

[00166] Los ligadores se describen en la bibliografía. (Véase, por ejemplo, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984) que describe el uso de MBS (éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida). Véase también, Patente Estadounidense No. 5,030,719, que describe el uso de derivado de acetil hidrazida halogenada acoplada a un anticuerpo por vía de un ligador de oligopéptido. Particularmente los ligadores preferidos incluyen: (i) clorhidrato de EDC (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)

carbodiimida; (ii) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-
 alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G);
 (iii) SPDP (succinimidil-6 [3-(2-piridilditio)
 propionamido]hexanoato (Pierce Chem. Co., Cat #216510); (iv)
 5 Sulfo-LC-SPDP hexanoato de (sulfosuccinimidil 6 [3-(2-
 piridilditio)-propianamida] (Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G); y
 (v) sulfo-NHS (N-hidroxisulfo-succinimida: Pierce Chem. Co., Cat.
 #24510) conjugado a EDC.

10 [00167] Los ligadores descritos anteriormente contienen
 componentes que tienen diferentes atributos, lo que lleva a
 conjugados con diferentes propiedades físico-químicas. Por
 ejemplo, los ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos de alquilo son
 más estables que los ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos
 15 aromáticos. El éster de NHS que contienen ligadores es menos
 solubles que los ésteres de sulfo-NHS. Adicionalmente, el ligador
 SMPT contiene una unión de disulfuro estéricamente impedida y
 puede formar conjugados con estabilidad en aumento. Los enlaces
 de disulfuro, son, en general, menos estables que otras uniones
 20 porque el enlace de disulfuro se divide *in vitro*, lo que resulta
 en menos conjugado disponible. El Sulfo-NHS, en particular, puede
 mejorar la estabilidad de los acoplamientos de carbodiimida. Los
 acoplamientos de carbodimida (tales como EDC) cuando se utilizan
 junto con sulfo-NHS, forman ésteres que son más resistentes a la
 25 hidrólisis que la reacción de acoplamiento de carbodiimida sola.

[00168] Los anticuerpos descritos en la aquí también se pueden
 formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el
 anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica,

tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. utiliza, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. utiliza, 77: 4030 (1980); y Patentes Estadounidenses Nos. 4,485,045 y 4,544,545. Los liposomas con tiempo de circulación
 5 mejorado se describen en la Patente Estadounidense No. 5,013,556.

[00169] Se pueden generar liposomas particularmente útiles por el método de evaporación de fase inversa con una composición lípida que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y
 10 fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas tal como se describe en Martin et al., J. Biol.
 15 Chem., 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro.

Uso de anticuerpos contra CD47

[00170] Se apreciará que la administración de entidades
 20 terapéuticas de acuerdo con la invención se administrará con portadores, excipientes, y otros agentes adecuados que se incorporan en formulaciones para proporcionar transferencia, suministro, tolerancia mejorada y similares. Una multitud de formulaciones adecuadas se puede encontrar en el formulario
 25 conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularmente el capítulo 87 por Blaug, Seymour, en el mismo. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos,

vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como lipofectina™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones aceite en agua y agua en aceite, emulsiones de Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares),
5 geles semisólidos, y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, siempre que el ingrediente activo en la formulación no sea inactivado por la formulación y esta sea fisiológicamente
10 compatible y tolerable con la ruta de administración. Véase también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance". Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals". Int. J. Pharm. 203(1-2): 1-60
15 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) y las citas incluidas para información adicional relacionada con
20 formulaciones, excipientes y portadores bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

[00171] En una realización, los anticuerpos de la invención, que incluyen un anticuerpo monoclonal de la invención, se pueden
25 utilizar como agentes terapéuticos. Dichos agentes se emplean generalmente para diagnosticar, pronosticar, controlar, tratar, aliviar, y/o prevenir una enfermedad o patología asociada con la expresión, actividad y/o señalización de CD47 aberrante en un sujeto. Un régimen terapéutico se lleva a cabo al identificar un

sujeto, *por ejemplo*, un paciente humano que sufre de (o en riesgo de desarrollar) una enfermedad o trastorno asociado con la expresión, actividad y/o señalización de CD47 aberrante, *por ejemplo*, un cáncer u otro trastorno neoplásico, utilizando métodos estándar. Una preparación de anticuerpos, preferiblemente uno que tenga alta especificidad y alta afinidad para su antígeno objetivo, se administra al sujeto y, generalmente tendrá un efecto debido a su unión con el objetivo. La administración del anticuerpo puede abrogar o inhibir o interferir con la función de expresión, actividad y/o señalización del objetivo (*por ejemplo*, CD47). La administración del anticuerpo puede abrogar o inhibir o interferir con la unión del objetivo (*por ejemplo*, CD47) con un ligando endógeno (*por ejemplo*, SIRP α) al que se une de forma natural. Por ejemplo, el anticuerpo se une al objetivo y modula, bloquea, inhibe, reduce, antagoniza, neutraliza, o de otra forma interfiere con la expresión, actividad y/o señalización de CD47.

[00172] Las enfermedades o trastornos relacionados con la expresión, actividad y/o señalización de CD47 aberrante incluyen, *por vía de ejemplo no limitante*, cáncer hematológico y/o tumores sólidos. Los cánceres hematológicos incluyen, *por ejemplo*, leucemia, linfoma y mieloma. Ciertas formas de leucemia incluyen, a modo de ejemplo no limitante, leucemia linfocítica aguda (ALL); leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia mielógena crónica (CML); trastorno mieloproliferativo/neoplasia (MPDS); y síndrome de mielodisplasia. Ciertas formas de linfoma incluyen, a modo de ejemplo no limitante, linfoma de Hodgkin, tanto linfoma no Hodgkin indolente como agresivo, linfoma de Burkitt, y el linfoma

follicular (células microcíticas y células no microcíticas).
Ciertas formas de mieloma incluyen, a modo de ejemplo no
limitante, mieloma múltiple (MM), mieloma de células gigantes,
mieloma de cadena pesada y cadena ligera o mieloma de Bence-
5 Jones. Los tumores sólidos incluyen, *por ejemplo*, tumores de
mama, tumores ováricos, tumores de pulmón, tumores pancreáticos,
tumores de próstata, tumores de melanoma, tumores colorrectales,
tumores de pulmón, tumores de cabeza y cuello, tumores de vejiga,
tumores esofágicos, tumores hepáticos y tumores renales.

10

[00173] Los síntomas asociados con el cáncer y otros trastornos
neoplásicos incluyen, por ejemplo, inflamación, fiebre, malestar
general, fiebre, dolor, a menudo localizado en el área inflamada,
pérdida de apetito, pérdida de peso, edema, dolor de cabeza,
15 fatiga, exantema, anemia , debilidad muscular, fatiga muscular y
síntomas abdominales tales como, por ejemplo, dolor abdominal,
diarrea o estreñimiento.

[00174] Una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo
20 de la invención se relaciona en general con la cantidad necesaria
para lograr un objetivo terapéutico. Como se observó
anteriormente, esta puede ser una interacción de unión entre el
anticuerpo y su antígeno objetivo que, en ciertos casos,
interfiere con el funcionamiento del objetivo. La cantidad
25 requerida que se va a administrar, adicionalmente, dependerá de
la afinidad de unión del anticuerpo por su antígeno específico, y
también dependerá del índice al que un anticuerpo administrado se
agota a partir del volumen libre de otro sujeto al que se
administra. Los rangos comunes para la dosificación

terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención pueden ser, a modo de ejemplo no limitante, desde aproximadamente 0.1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Las frecuencias de dosificación comunes pueden variar, por ejemplo, de dos veces al día a una vez a la semana.

[00175] La eficacia del tratamiento se determina en asociación con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar el trastorno relacionado con la inflamación particular. El alivio de uno o más síntomas del trastorno relacionado con la inflamación indica que el anticuerpo confiere un beneficio clínico.

[00176] Los métodos para la detección de anticuerpos que poseen la especificidad deseada incluyen, pero no se limitan a, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y otras técnicas mediadas inmunológicamente conocidas dentro del arte.

[00177] En otra realización, los anticuerpos dirigidos contra CD47 se pueden utilizar en métodos conocidos en la técnica relacionados con la localización y/o cuantificación de CD47 (*por ejemplo*, para su uso en medir los niveles de CD47 y/o CD47 y SIRP α dentro de muestras fisiológicas apropiadas, para uso en métodos de diagnóstico, para su uso en formación de imágenes de la proteína, y similares). En una realización dada, los anticuerpos específicos a CD47, o un derivado, fragmento, análogo u homólogo del mismo, que contiene el anticuerpo derivado de dominio de unión a antígeno, se utilizan como compuestos

farmacológicamente activos (denominados en lo sucesivo como “productos terapéuticos”).

[00178] En otra realización, se puede utilizar un anticuerpo
5 específico para CD47 para aislar un polipéptido de CD47, mediante técnicas estándar, tales como inmunoafinidad, cromatografía o inmunoprecipitación. Los anticuerpos dirigidos contra la proteína CD47 (o un fragmento de la misma) se pueden utilizar de forma diagnóstica para monitorear los niveles de proteína en tejido
10 como parte de un procedimiento de ensayo clínico, *por ejemplo*, para, *por ejemplo*, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse al acoplar (es decir, unir físicamente) el anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas
15 enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos
20 adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye
25 luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina, y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

[00179] En otra realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención se puede utilizar como un agente para detectar la presencia de proteína de CD47 y/o CD47 y SIRP α (o un fragmento de proteína del mismo) en una muestra. En algunas realizaciones, el anticuerpo contiene un marcador detectable. Los anticuerpos son policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Se utiliza un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (*por ejemplo*, Fab, scFv, o F(ab')₂). El término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, está destinado a abarcar el marcado directo de la sonda o anticuerpo por acoplamiento (*es decir*, unir físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como también marcado indirecto de la sonda o anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que se marca directamente. Los ejemplos de marcado indirecto incluyen detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y marcado de extremo de una sonda de ADN con biotina de tal manera que se puede detectar con estreptavidina marcada fluorescentemente. El término "muestra biológica" está destinado a incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Por lo tanto, se incluye dentro del uso del término "muestra biológica", sangre y una fracción o componente de la misma, que incluye suero sanguíneo, plasma sanguíneo, o linfa. Es decir, el método de detección de la invención se puede utilizar para detectar un ARNm analito, proteína, o ADN genómico en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de un ARNm de analito incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de

un analito de proteína incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para detección de un analito de ADN genómico incluyen hibridaciones Southern. Los procedimientos para realizar inmunoensayos se describen, por ejemplo en "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis y T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; y "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Adicionalmente, las técnicas *in vivo* para la detección de una proteína de analito incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo de proteína anti-analito marcado. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto se puede detectar mediante técnicas de imagen estándar.

Administración Terapéutica y Formulaciones de Anticuerpos CD47

[00180] Los anticuerpos de la invención (también denominados aquí como "compuestos activos"), y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Se proporcionan los principios y consideraciones implicadas en la preparación de dichas composiciones, así como la guía en la elección de los componentes, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; y

Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

[00181] Dichas composiciones normalmente comprenden el anticuerpo
5 y un portador farmacéuticamente aceptable. Cuando se utilizan
fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más
pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la
proteína objetivo. Por ejemplo, con base en las secuencias de
región variable de un anticuerpo, las moléculas de péptidos se
10 pueden diseñar ya que retienen la capacidad de unirse a la
secuencia de la proteína objetivo. Se pueden sintetizar dichos
péptidos químicamente y/o producir mediante tecnología de ADN
recombinante. (Véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc Natl Acad
Sci. USA, 90: 7889 a 7893 (1993)).

15 [00182] Como se utiliza aquí, el término "portador
farmacéuticamente aceptable" está destinado a incluir cualquiera
y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos,
agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y
20 retardantes de absorción, y similares, compatibles con la
administración farmacéutica. Los portadores adecuados se
describen en la edición más reciente de Remington Pharmaceutical
Sciences, un texto de referencia estándar en el campo, que se
incorpora aquí como referencia. Los ejemplos preferidos de dichos
25 portadores o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua,
solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y 5%
de albúmina de suero humano. También se pueden utilizar liposomas
y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de dichos
medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es

bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones.

5 [00183] Las formulaciones que se van a utilizar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

10 [00184] Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración destinada. Ejemplos de rutas de administración incluyen administración parenteral, *por ejemplo*, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (*por ejemplo*, inhalación), transdérmica (*es decir*, tópica),
15 transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes
20 sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); reguladores tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de
25 tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o frascos de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

[00185] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (si son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor™ EL (BASF, Parsippany, NJ) o salina regulada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable bajo condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar al incluir en la

composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[00186] Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y secado por congelamiento que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

[00187] Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimir en tabletas. Para el propósito de administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y utilizar en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un vehículo fluido para su uso como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica oralmente y se hacen buches, se expectora o traga. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden

contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como una celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo, o aromatizante de naranja.

10

[00188] Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de una pulverización de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, *por ejemplo*, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

15

[00189] La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración de transmucosa o transdérmica, los penetrantes apropiados para la barrera a ser permeada se utilizan en la formulación. Dichos penetrantes generalmente se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr a través del uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

20

25

[00190] Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (*por ejemplo*, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

5

[00191] En una realización, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tales como formulaciones de liberación controlada/sostenida, que incluyen implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Los polímeros biodegradables, biocompatibles se pueden utilizar, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica.

15

[00192] Por ejemplo, los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

25

[00193] Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de

artículos conformados, *por ejemplo*, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato), o poli (alcohol vinílico)), polilactidas (Patente Estadounidense No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y 5 γ etil-L-glutamato, acetato no degradable de etileno-vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de 10 leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos.

15 [00194] Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos víricos) y 20 también se pueden utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,522,811.

25 [00195] Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias

para el sujeto que se va a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención están dictadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va alcanzar, y las limitaciones inherentes en la técnica de componer dicho un compuesto activo para el tratamiento de individuos.

10

[00196] Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, empaque, o dispensador junto con instrucciones para administración.

15 [00197] La formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico, o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para los propósitos previstos.

25

[00198] En una realización, los compuestos activos se administran en terapia de combinación, es decir, combinada con otros agentes, por ejemplo, productos terapéuticos, que son útiles para tratar afecciones o trastornos patológicos, tales como diversas formas

de cáncer, trastornos autoinmunes y enfermedades inflamatorias. El término “en combinación” en este contexto significa que los agentes se proporcionan contemporáneamente sustancialmente, ya sea simultánea o secuencialmente. Si se proporciona
5 secuencialmente, en el inicio de la administración del segundo compuesto, el primero de los dos compuestos es preferiblemente aún detectable en concentraciones efectivas en el sitio de tratamiento.

10 [00199] Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir uno o más anticuerpos de la invención coformulada con y/o se coadministra con, uno o más productos terapéuticos adicionales, *por ejemplo*, uno o más inhibidores de citoquinas y de factor de crecimiento, inmunosupresores, agentes anti-inflamatorios,
15 inhibidores metabólicos, inhibidores de enzimas, y/o agentes citotóxicos o citostáticos, como se describe en más detalle adelante. Dichas terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosis más bajas de los productos terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones
20 asociadas con las diversas monoterapias.

[00200] Los agentes terapéuticos preferidos utilizados en combinación con un anticuerpo de la invención son aquellos agentes que interfieren en diferentes etapas en una respuesta
25 inflamatoria. En una realización, uno o más anticuerpos descritos aquí se pueden coformular con, y/o coadministrarse con, uno o más agentes adicionales, tales como otras citoquinas o antagonistas del factor de crecimiento (por ejemplo, receptores solubles, inhibidores peptídicos, moléculas pequeñas, fusiones de ligando);

o anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a otros objetivos (*por ejemplo*, anticuerpos que se unen a otras citoquinas o factores de crecimiento, sus receptores, u otras moléculas de la superficie celular); y citoquinas anti-inflamatorias o agonistas de las mismas.

[00201] En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención se utilizan como adyuvantes de vacunas contra trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias, etc. La combinación de adyuvantes para el tratamiento de estos tipos de trastornos son adecuados para uso en combinación con una amplia variedad de antígenos a partir autoantígenos objetivados, es decir, autoantígenos, implicados en la autoinmunidad, *por ejemplo*, proteína básica de mielina; autoantígenos inflamatorios, *por ejemplo*, proteína de péptido amiloide, o antígenos de trasplante, *por ejemplo*, aloantígenos. El antígeno puede comprender péptidos o polipéptidos derivados de proteínas, así como también fragmentos de cualquiera de los siguientes: sacáridos, proteínas, polinucleótidos u oligonucleótidos, autoantígenos, proteína de péptido amiloide, antígenos de trasplante, alérgenos, u otros componentes macromoleculares. En algunos casos, se incluye más de un antígeno en la composición antigénica.

Diseño y Generación de otros Productos Terapéuticos

[00202] de acuerdo con la presente invención y con base en la actividad de los anticuerpos que se producen y caracterizan aquí con respecto a CD47, se facilita el diseño de otras modalidades terapéuticas más allá de los restos de anticuerpo. Dichas modalidades incluyen, sin limitación, agentes terapéuticos de

anticuerpos avanzados, tales como anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas, y agentes terapéuticos radiomarcados, generación de agentes terapéuticos peptídicos, terapias génicas, particularmente intracuerpos, agentes terapéuticos anticodificante, y moléculas pequeñas.

[00203] Por ejemplo, en relación con los anticuerpos biespecíficos, se pueden generar anticuerpos biespecíficos que comprenden (i) dos anticuerpos - uno con una especificidad para CD47 y otro para una segunda molécula que se conjuga en conjunto, (ii) un único anticuerpo que tiene una cadena específica a CD47 y una segunda cadena específica para una segunda molécula, o (iii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad para CD47 y una segunda molécula. Dichos anticuerpos biespecíficos se generan utilizando técnicas que son bien conocidas por ejemplo, en relación con (i) y (ii) Véase *por ejemplo*, Fanger *et al.* Immunol Methods 4:72-81 (1994) y Wright *et al.* Crit, Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992), y en relación con (iii) Véase, *por ejemplo*, Traunecker *et al.* Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992).

[00204] En relación con las inmunotoxinas, se pueden modificar los anticuerpos para actuar como inmunotoxinas utilizando técnicas que son bien conocidas en el arte. Véase, *por ejemplo*, Vitetta Immunol Today 14:252 (1993). Véase también Patente Estadounidense No. 5,194,594. En relación con la preparación de anticuerpos radiomarcados, también se pueden preparar dichos anticuerpos modificados fácilmente utilizando técnicas que son bien conocidas en el arte. Véase, *por ejemplo*, Junghans *et al.* en

Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Véase también Patentes Estadounidenses Nos. 4,681,581, 4,735,210, 5,101,827, 5,102,990 (RE 35,500), 5,648,471, y 5,697,902. Cada una de las
5 inmunotoxinas y moléculas radiomarcadas probablemente matarían las células que expresan CD47.

[00205] En relación con la generación de péptidos terapéuticos, a través de la utilización de la información estructural
10 relacionada con CD47 y anticuerpos de los mismos, tales como los anticuerpos de la invención o la detección de colecciones de péptidos, se pueden generar péptidos terapéuticos que se dirigen contra CD47. El diseño y detección de los agentes terapéuticos de péptido se discute en relación con Houghten *et al.* Biotechniques
15 13:412-421 (1992), Houghten PNAS utiliza. 82:5131-5135 (1985), Pinalla *et al.* Biotechniques 13:901-905 (1992), Blake and Litzi-Davis Bioconjugate Chem. 3:510-513 (1992). También se pueden preparar inmunotoxinas y moléculas radiomarcadas, y de una manera similar, en relación con restos peptídicos como se discutió
20 anteriormente en relación con anticuerpos. Suponiendo que la molécula de CD47 (o una forma, tal como una variante de empalme o forma alternativa) es funcionalmente activa en un proceso de enfermedad, también será posible diseñar genes y agentes terapéuticos anticodificantes de los mismos a través de técnicas
25 convencionales. Dichas modalidades se pueden utilizar para modular la función de CD47. En relación con esto los anticuerpos de la presente invención facilitan el diseño y uso de ensayos funcionales relacionados con la misma. Un diseño y estrategia para productos terapéuticos anticodificante se discute en detalle

en la Solicitud de Patente Internacional No. WO 94/29444. El diseño y estrategias para la terapia génica son bien conocidos. Sin embargo, en particular, el uso de técnicas terapéuticas de genes que implican intracuerpos podría demostrar ser particularmente ventajoso. Véase, por ejemplo, Chen *et al.* Human Gene Therapy 5:595-601 (1994) y Marasco Gene Therapy 4: 11-15 (1997). El diseño general y consideraciones relacionadas con los terapéuticos de genes también se discute en la Solicitud de Patente Internacional No. WO 97/38137.

10

[00206] Los conocimientos obtenidos de la estructura de la molécula de CD47 y sus interacciones con otras moléculas de acuerdo con la presente invención, tales como SIRP α y/o los anticuerpos de la invención, y otros se puede utilizar para diseñar racionalmente modalidades terapéuticas adicionales. A este respecto, las técnicas de diseño racional de fármacos, tales como cristalografía de rayos X, modelado molecular auxiliado (o asistido) por computador (CMM), relación estructura-actividad cuantitativa o cualitativa (QSAR), y tecnologías similares se pueden utilizar para centrar los esfuerzos de descubrimiento de fármacos. El diseño racional permite la predicción de proteína o estructuras sintéticas que pueden interactuar con la molécula o las formas específicas de la misma que se puede utilizar para modificar o modular la actividad de IL-6RC. Dichas estructuras se pueden sintetizar químicamente o expresar en sistemas biológicos. Este método se ha revisado en Capsey *et al.* Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs (Stockton Press, NY (1988)). Adicionalmente, las colecciones combinatorias se pueden diseñar y

15

20

25

sintetizar y utilizar en programas de detección, tales como esfuerzos de detección de alto rendimiento.

Métodos de Detección

5 [00207] La invención proporciona métodos (también denominados aquí como "ensayos de detección") para identificar moduladores, *es decir*, candidatos o compuestos de prueba o agentes (*por ejemplo*, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que modulan o de otra manera interfieren con la unión

10 de CD47 a SIRP α , o compuestos o candidatos de prueba o agentes que interfieren con la función de señalización de CD47 y/o CD47-SIRP α . También se proporcionan métodos para identificar compuestos útiles para tratar trastornos asociados con expresión, actividad y/o señalización de CD47 y/o de CD47-SIRP α aberrante.

15 Los métodos de detección pueden incluir aquellos conocidos o utilizados en la técnica o los descritos aquí. la absorbancia Posteriormente, el SIRP α unido se puede detectar utilizando un anticuerpo secundario, y se puede detectar en un lector de placas.

20

[00208] También se proporcionan métodos para identificar compuestos capaces de promover fagocitosis de células tumorales por los macrófagos. Estos métodos pueden incluir aquellos conocidos o utilizados en la técnica o descritos aquí. Por

25 *ejemplo*, los macrófagos se incuban con células tumorales marcadas en presencia de un compuesto candidato, *por ejemplo*, un anticuerpo CD47. Después de un período de tiempo, se pueden observar los macrófagos para la internalización de la etiqueta del tumor para identificar fagocitosis. Se a proporcionan en los

ejemplos detalles adicionales con respecto estos métodos, *por ejemplo*, ensayos que bloquean SIRP α y ensayos de fagocitosis.

[00209] La invención también incluye compuestos identificados en los ensayos de detección descritos aquí.

[00210] En una realización, la invención proporciona ensayos para detectar compuestos candidatos o de prueba que modulan la función de señalización de CD47. Los compuestos de prueba de la invención se pueden obtener utilizando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de colecciones combinatorias conocidos en la técnica, que incluyen: colecciones biológicas; colecciones de fase sólida o de fase en solución paralelas espacialmente direccionables; métodos de colecciones sintéticas que requieren desconvolución; el método de colección de “una perla un compuesto”; y métodos de colecciones sintéticas que utilizan selección por cromatografía de afinidad. El método de colección biológica se limita a colecciones de péptidos, mientras que los otros cuatro métodos son aplicables a péptidos, oligómeros no peptídicos o colecciones de pequeñas moléculas de compuestos. (Véase, *por ejemplo*, Lam, 1997 Anticancer Drug Design 12: 145).

[00211] Una “molécula pequeña”, como se utiliza aquí, se pretende que se refiera a una composición que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 5 kD y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 4 kD. Las moléculas pequeñas pueden ser, *por ejemplo*, ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. Las colecciones de mezclas químicas y/o

biológicas, tales como hongos, bacterias, o extractos de algas, reconocen en la técnica y se pueden detectar con cualquiera de los ensayos de la invención.

5 [00212] Ejemplos de métodos para la síntesis de colecciones moleculares se pueden encontrar en la técnica, por ejemplo en : DeWitt, et al., 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909; Erb, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 : 11422; Zuckermann, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 2678; Cho, et al.,
 10 1993. Science 261 : 1303; Carrell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061 ; y Gallop, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 1233.

15 [00213] Las colecciones de compuestos pueden estar presentes en solución (véase por ejemplo, Houghten, 1992. Biotechniques 13: 412-421), o en perlas (véase Lam, 1991. Nature 354: 82-84), en chips (véase Fodor, 1993. Nature 364: 555-556), bacterias (véase Patente Estadounidense No. 5,223,409), esporas (véase Patente
 20 Estadounidense 5,233,409), plásmidos (véase Cull, et al., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. utiliza 89: 1865-1869) o en fago (véase Scott y Smith, 1990. Science 249: 386-390; Devlin, 1990. Science 249: 404-406; Cwirla, et al., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6378-6382; Felici, 1991. J. Mol. Biol. 222: 301-310; y
 25 Patente Estadounidense No. 5,233,409).

[00214] En una realización, un compuesto candidato se introduce a un complejo de anticuerpo-antígeno y se determina si el compuesto candidato interrumpe el complejo de antígeno-anticuerpo, en donde

una interrupción de este complejo indica que el compuesto candidato modula la función de señalización de CD47 y/o la interacción entre CD47 y SIRP α . En otra realización, se proporciona una proteína soluble CD47 y/o CD47 y SIRP α de la invención y se expone a por lo menos un anticuerpo monoclonal neutralizante. Se detecta la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno, y se introducen uno o más compuestos candidatos al complejo. Si el complejo de antígeno-anticuerpo se interrumpe luego de la introducción de uno o más compuestos candidatos, los compuestos candidatos son útiles para tratar trastornos asociados con señalización de CD47 y/ de CD47-SIRP α aberrante.

[00215] Se puede lograr la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para interferir con o interrumpir el complejo de anticuerpo-antígeno, por ejemplo, al acoplar el compuesto de prueba con un radioisótopo o etiqueta enzimática de tal manera que se puede determinar la unión del compuesto de prueba al antígeno o porción biológicamente activa del mismo al detectar el compuesto marcado en un complejo. Por ejemplo, los compuestos de prueba se pueden marcar con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^3H , ya sea directamente o indirectamente, y el radioisótopo detectado mediante conteo directo de radioemisión o mediante conteo de centelleo. Alternativamente, los compuestos de prueba se pueden marcar enzimáticamente-con, por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, o luciferasa, y la etiqueta enzimática detectada mediante determinación de la conversión de un sustrato apropiado a producto.

[00216] En una realización, el ensayo comprende poner en contacto un complejo de anticuerpo-antígeno con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad de este para interaccionar con el antígeno o de otra forma interrumpir el complejo de anticuerpo-antígeno existente. En esta realización, determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con el antígeno y/o interrumpir el complejo de anticuerpo-antígeno comprende determinar la capacidad del compuesto de prueba para unirse de forma preferencial al antígeno o una porción biológicamente activa del mismo, en comparación con el anticuerpo.

[00217] En otra realización, el ensayo comprende poner en contacto un complejo de anticuerpo-antígeno con un compuesto de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular el complejo de anticuerpo-antígeno. Se puede lograr la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para modular el complejo de anticuerpo-antígeno, por ejemplo, al determinar la capacidad del antígeno para unirse o interactuar con el anticuerpo, en presencia del compuesto de prueba.

20

[00218] Aquellos expertos en la técnica reconocerán que, en cualquiera de los métodos de detección descritos aquí, el anticuerpo puede ser un anticuerpo neutralizante, que modula o de otra forma interfiere con la actividad y/o la señalización de CD47.

25

[00219] Los métodos de detección descritos aquí se pueden realizar como un ensayo basado en células o como un ensayo libre de células. Los ensayos libres de células de la invención son

susceptibles al uso de ya sea de la forma soluble o la forma unida a membrana de CD47 y fragmentos de los mismos. En el caso de ensayos libres de células que comprenden la forma unida a membrana de CD47, puede ser deseable utilizar un agente de solubilización de tal manera que la forma unida a membrana de las proteínas se mantiene en solución. Ejemplos de dichos agentes de solubilización incluyen detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit® , Isotridecipoli(etilenglicol éter)_n, sulfonato de N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano, sulfonato de 3-(3-colamidopropil) dimetilamminiol-1-propano (CHAPS), o sulfonato de 3- (3 -colamidopropil) dimetilamminiol-2-hidroxil-1-propano (CHAPSO).

15

[00220] En más de una realización, puede ser deseable inmovilizar ya sea el anticuerpo o el antígeno para facilitar la separación de formas complejadas de no complejadas de una o ambas luego de la introducción del compuesto candidato, así como también acomodar la automatización del ensayo. Se puede realizar la observación del complejo de anticuerpo-antígeno en presencia y ausencia de un compuesto candidato en cualquier recipiente adecuado para contener reactivos. Ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. En una realización, se puede proporcionar una proteína de fusión que agrega un dominio que permite que una o ambas de las proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión de anticuerpos- GST o proteínas de fusión de antígeno- GST se pueden adsorber sobre perlas de sefarosa

25

glutación (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivadas de glutación, que luego se combinan con el compuesto de prueba, y la mezcla se incuba bajo condiciones que conducen a formación de complejos (*por ejemplo*, en 5 condiciones fisiológicas para sal y pH). Después de incubación, las perlas o pozos de placa de microtitulación se lavan para eliminar cualesquier componentes no unidos, la matriz inmovilizada en el caso de las perlas, forma complejo determinado ya sea directamente o indirectamente. Alternativamente, los 10 complejos se pueden disociar de la matriz, y el nivel de la formación de complejo de anticuerpo-antígeno se puede determinar utilizando técnicas estándar.

[00221] También se pueden utilizar otras técnicas para 15 inmovilizar proteínas sobre matrices en los ensayos de detección de la invención. Por ejemplo, ya sea el anticuerpo (*por ejemplo*, el anticuerpo 2A1, o un anticuerpo que tiene una cadena pesada variable seleccionada de las SEQ ID NOs: 5-30 y una cadena ligera variable seleccionada entre las SEQ ID NO: 31-47) o el antígeno 20 (*por ejemplo*, proteína CD47) se puede inmovilizar utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. Se pueden preparar anticuerpos o moléculas de antígenos biotiniladas a partir de biotina-NHS (N-hidroxí-succinimida) utilizando técnicas bien conocidas en el arte (*por ejemplo*, kit de biotinilación, Pierce 25 Chemicals, Rockford, III.), y se inmovilizan en los pozos de placas de 96 pozos recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, otros anticuerpos reactivos con el anticuerpo o antígeno de interés, pero que no interfieren con la formación del complejo de anticuerpo-antígeno de interés, se

pueden derivar a los pozos de la placa, y el anticuerpo no unido o antígeno atrapado en los pozos mediante conjugación de anticuerpos. Los métodos para detectar dichos complejos, adicionalmente a los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen inmunodetección de complejos utilizando dichos otros anticuerpos reactivos con el anticuerpo o antígeno.

[00222] La invención se refiere adicionalmente a nuevos agentes identificados por cualquiera de los ensayos de detección mencionados anteriormente y usos de los mismos para tratamientos como se describe aquí.

Formulaciones de Diagnóstico y Profilácticas

[00223] Los MAb de CD47 de la invención se utilizan en formulaciones de diagnóstico y profilácticas. En una realización, un MAb de CD47 de la invención se administra a pacientes que están en riesgo de desarrollar una o más de las enfermedades mencionadas anteriormente, tales como por ejemplo, sin limitación, cáncer u otra afección neoplásica. Una predisposición del órgano del paciente a uno o más de los cánceres mencionados anteriormente u otras afecciones neoplásicas se pueden determinar utilizando marcadores genotípicos, serológicos o bioquímicos.

[00224] En otra realización de la invención, el anticuerpo CD47 se administra a individuos humanos diagnosticados con una indicación clínica asociada con una o más de las enfermedades mencionadas anteriormente, tales como por ejemplo, sin limitación, cáncer u otra afección neoplásica. Luego del

diagnóstico, el anticuerpo CD47 se administra para mitigar o revertir los efectos de la indicación clínica asociada con una o más de las enfermedades mencionadas anteriormente.

5 [00225] Los anticuerpos de la invención también son útiles en la detección de CD47 y/o SIRP α en muestras de pacientes y de acuerdo con lo anterior son útiles como productos de diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención se utilizan en ensayos *in vitro*, *por ejemplo*, ELISA, para detectar los niveles
10 de CD47 y/o SIRP α en una muestra del paciente.

[00226] En una realización, un anticuerpo CD47 de la invención se inmoviliza sobre un soporte sólido (*por ejemplo*, el pozo (s) de una placa de microtitulación). El anticuerpo inmovilizado sirve
15 como un anticuerpo de captura para cualquier CD47 y/o SIRP α que puede estar presente en una muestra de prueba. Antes de poner en contacto el anticuerpo inmovilizado con una muestra del paciente, el soporte sólido se enjuaga y se trata con un agente de bloqueo tal como proteína de la leche o albúmina para evitar la adsorción
20 no específica del analito.

[00227] Posteriormente se tratan los pozos con una muestra de prueba que se sospecha contiene el antígeno, o con una solución que contiene una cantidad estándar del antígeno. Dicha muestra
25 es, k, una muestra de suero de un sujeto sospechoso de tener niveles de antígeno circulante, lo que se considera diagnóstico de una patología. Después de enjuagar la muestra de prueba o estándar, el soporte sólido se trata con un segundo anticuerpo que se marca de forma detectable. El segundo anticuerpo marcado

sirve como anticuerpo de detección. Se mide el nivel de marcador detectable, y la concentración de CD47 y/o SIRP α en la muestra de prueba se determina mediante comparación con una curva estándar desarrollada a partir de las muestras estándar.

5

[00228] Se apreciará que en base a los resultados obtenidos utilizando los anticuerpos CD47 de la invención en un ensayo de diagnóstico *in vitro*, es posible determinar el estadio de una enfermedad (*por ejemplo*, una indicación clínica asociada con

10 isquemia, un trastorno autoinmune o inflamatorio) en un sujeto basado en los niveles de expresión de CD47 y/o SIRP α . Para una enfermedad dada, las muestras de sangre se toman de sujetos diagnosticados que tienen diversas etapas en el progreso de la enfermedad, y/o en diversos puntos en el tratamiento terapéutico

15 de la enfermedad. Utilizando una población de muestras que proporciona resultados estadísticamente significativos para cada etapa del progreso o terapia, se designa un rango de concentraciones del antígeno que puede considerarse característico de cada etapa.

20

[00229] Todas las publicaciones y documentos de patente citados en este documento se incorporan aquí mediante referencia como si cada una de dicha publicación o documento se indicará específica e individualmente para ser incorporada mediante por referencia.

25 La citación de publicaciones y documentos de patentes no se debe interpretar como una admisión de que es pertinente cualquiera técnica anterior, ni constituye alguna admisión a los contenidos o fechas de los mismos. La invención ahora se ha descrito por vía de descripción escrita, aquellos expertos en la técnica

reconocerán que la invención se puede poner en práctica en una variedad de realizaciones y que la descripción anterior y los ejemplos adelante son para propósitos de ilustración y no de limitación de las reivindicaciones que siguen.

5

EJEMPLOS

[00230] Se proporcionan los siguientes ejemplos, que incluyen los experimentos conducidos y resultados logrados solo para
10 propósitos ilustrativos y no se deben interpretar como limitantes luego de la presente invención.

EJEMPLO 1: Generación y Selección de Anticuerpos CD47

[00231] Se generan anticuerpos CD47 al inmunizar ratones con una
15 proteína recombinante que representa CD47-IgV (tipo variable similar a inmunoglobulina), implementar una estrategia de inmunización rápida modificada en sitios múltiples (Kilpatrick et al. (1997) Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies utilizando RIMMS. Hybridoma 16, 381-389).
20 Adicionalmente, la mitad de los ratones en el grupo inmunizado reciben una única inyección del anticuerpo agonista GITR anti-ratón, DTA-1. Luego de la programación de inmunización, se cosechan los nodos linfáticos de todos ratones (DTA-1 tratado y no tratado) y se disocian, permitiendo de esta manera el
25 aislamiento de célula B y posterior fusión a una estirpe celular de mieloma de ratón. Se detectan sobrenadantes de hibridoma para unirse a CD47 mediante ELISA y mediante citometría de flujo en células Daudi (ATCC# CCL-213) (Figura 1A). Los sobrenadantes de hibridoma también se analizan para la capacidad de bloquear la

interacción de CD47-SIRP α (Figura 1B). Se inmoviliza CD47 recombinante sobre una placa de microtítulo Medisorp (NUNC) y posteriormente se incuba con los sobrenadantes de hibridoma en la presencia de SIRP α -ECD humano recombinante fusionado a un dominio IgG Fc humano. El SIRP α unido se detecta utilizando un anticuerpo secundario específico a IgG Fc anti- humano conjugado HRP (Jackson Immuno Research), y la absorbancia en 650 nm detectado en lector de placa.

EJEMPLO 2: Caracterización de Anticuerpos CD47

[00232] Los anticuerpos CD47 de murino de ejemplo de la presente invención se muestran en la Figura 2. Se conduce clasificación de afinidad de SIRP α que bloquea anticuerpos CD47 mediante citometría de flujo sobre células Raji (ATCC# CCL-86) (Figura 2A) y CCRF-CEM (ATCC# CCL-119) (Figura 2B). Se detectan los anticuerpos CD47 unidos utilizando un anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado FITC (Jackson ImmunoResearch). El anticuerpo CD47 conocido en la técnica, B6H12, se incluye como un control positivo (Véase, por ejemplo, Patente Estadounidense 5,057,604). En la Figura 2B, el B6H12 y el 2D3, un anticuerpo de bloqueo sin SIRP α comercialmente disponible, se comparan con los anticuerpos generados aquí. Los anticuerpos de la presente invención exhiben mayor afinidad hacia la forma endógena (superficie celular) de CD47 comparado con los anticuerpos B6H12 y 2D3.

EJEMPLO 3: Actividad de Bloqueo SIRP α de Anticuerpos CD47

[00233] La potencia del bloqueo de SIRP α por los anticuerpos CD47 se mide por una ELISA en donde se inmoviliza His-objetivado-CD47-IgV recombinante sobre una placa de microtítulo Medisorp. La

unión del SIRP α recombinante fusionado a un dominio Fc de IgG humano se monitorea en la presencia de cantidades en aumento de los anticuerpos CD47. Se determina el SIRP α unido utilizando un anticuerpo secundario de IgG anti-humano conjugado de HRP (Fc específico) (Jackson ImmunoResearch). Los anticuerpos de la presente invención exhiben potencia mejorada de bloqueo de SIRP α en comparación con el anticuerpo B6H12. La Figura 3A muestra datos representativos del ELISA basado en ensayo de bloqueo de SIRP α .

10

[00234] Se analizan anticuerpos CD47 mediante citometría de flujo por su capacidad para bloquear la unión de SIRP α recombinante al CD47 de superficie celular. E utilizan células CCRF-CEM (ATCC# CCL-119) como la fuente de CD47 en el ensayo y unión de SIRP α recombinante fusionado a un dominio Fc de IgG humano se monitorea en la presencia de cantidades en aumento de los anticuerpos CD47. Se determina el SIRP α unido utilizando un anticuerpo secundario IgG anti-humano conjugado APC (Fc específico) (Jackson ImmunoResearch) (Figura 3B). El B6H12 y no SIRP α bloquean el anticuerpo CD47 2D3 cuando utilizan controles positivo y negativo respectivamente.

20

EJEMPLO 4: Interacciones Homotípicas mediadas por anticuerpo CD47

[00235] Los anticuerpos CD47 de bloqueo de SIRP α se analizan para su capacidad de inducir agrupamiento celular, que se conoce como interacciones homotípicas, entre células positivas a CD47. Se utilizan células Daudi y Raji como estirpes de células que expresan CD47 candidatas. Entre los anticuerpos examinados, el anticuerpo 2A1 de la presente invención es el único anticuerpo de

25

bloqueo de $\text{SIRP}\alpha$ que no promueve interacciones homotípicas de células que expresan CD47.

EJEMPLO 5: Actividad de hemoaglutinación de Anticuerpos CD47

5 [00236] Un ejemplo de una interacción homotípica es la hemoaglutinación, como se evidencia por agregación de RBC. Se detectan anticuerpos CD47 para aglutinación RBC, cuando se observa por la capacidad de un anticuerpo para evitar la sedimentación de RBS humanos. de forma inesperada, se encuentra
10 que el anticuerpo 2A1 es único entre otros anticuerpos CD47 para su capacidad de promover hemoaglutinación, mientras que tiene alta afinidad y la capacidad de bloquear el $\text{SIRP}\alpha$. Otros anticuerpos que exhiben hemoaglutinación reducida no bloquean la unión de $\text{SIRP}\alpha$ a CD47.

15 [00237] Para evaluar la capacidad de hemoaglutinación de anticuerpos CD47, los RBS humanos se diluyen al 10% en PBS y se incuban a 37°C durante 2 a 6 horas con una valoración de anticuerpos CD47 en una placa de 96 pozos de fondo redondo. La
20 evidencia de la hemoaglutinación se demuestra por la presencia de RBC no sedimentados, que aparecen como una bruma en comparación con un punto rojo acentuado de RBC no hemoaglutinados. de forma inesperada, como se muestra en la Figura 4A, los anticuerpos CD47 de la invención, particularmente el anticuerpo denominado como
25 2A1, no exhibe actividad de hemoaglutinación. La gráfica muestra la cuantificación del ensayo de hemoaglutinación, denota el “índice de hemoaglutinación” determina al cuantificar el área del sedimento de RBC en la presencia del anticuerpo, normalizado con aquel en la ausencia del anticuerpo.

[00238] El anticuerpo 9E4 de murino provocado la hemoaglutinación más profunda en todas las concentraciones probadas. de esta manera, el anticuerpo 9E4 se une a CD47 y la interacción bloquea CD47 con SIRP α ; sin embargo, el anticuerpo 9E4 provoca hemoaglutinación.

[00239] Se proporciona adelante la región de cadena VH del anticuerpo 9E4.

EVQLRQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYMYWVKQSRVRS¹LAWIGRINPYTGATGYDQNF²KDKASLIVDK³
SSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGR⁴NR⁵YDGNFAYWGQGT⁶LVTV (SEQ ID NO: 78)

[00240] Se proporciona adelante la región de cadena VL del anticuerpo 9E4.

EIQMTQTITSSLSASLGD¹RV²TISCRASQDISNYLNWYQ³KPDGIVKLLIYYISRLHSGVPSRFSGSGSGIDYSLT⁴
ISNLDQEDIATYFCQQGNALPPTFGGGTNLEIK (SEQ ID NO: 79)

[00241] El anticuerpo de control B6H12 provoca la hemoaglutinación como se espera para el bloqueo de anticuerpos CD47 de SIRP α .

[00242] Con el fin de investigar la singularidad de la actividad de sin hemoaglutinación del anticuerpo 2A1, se detectan otros anticuerpos CD47 numerosos en el ensayo de hemoaglutinación de RBC (Figura 4B). Se incluye en este ensayo la versión quimérica del anticuerpo 2A1 (2A1-xi), que consiste de la región de cadena pesada variable de murino de 2A1, la región de cadena liviana variable de murino de 2A1 modificada en el aminoácido 106 (es decir, M106I), y las regiones constantes de IgG1 humano y I κ humano. Las secuencias de la región VH y VL del anticuerpo 2A1 y

anticuerpo 2A1-xi se proporcionan en la Tabla 1. Se prueban los anticuerpos a 12.5, 25, 50, y 100 nM. de forma inesperada, 2A1 es raro entre los anticuerpos CD47 examinados en la Figura 4B, en el que es solo el anticuerpo en la Figura 4B con actividades de hemoaglutinación ausentes o reducidas. La Figura 4E muestra que 2A1, 2A1 quimérico (2A1-xi), y variantes humanizadas no provocan hemoaglutinación.

[00243] La Figura 4C muestra los resultados de la detección de anticuerpos CD47 adicionales en el ensayo de hemoaglutinación de RBC. Como se muestra en la Figura 4C, el anticuerpo monoclonal CD47 2D3, que no bloquea SIRP α , no provoca hemoaglutinación. Sin embargo, otros anticuerpos CD47 disponibles comercialmente (por ejemplo, CC2C6, BRC126, y B6H12) que bloquea SIRP α provocando hemoaglutinación (Figura 4C). de esta manera, antes de la invención descrita aquí, los anticuerpos existentes que bloquean SIRP α provocan hemoaglutinación, mientras que los anticuerpos existentes, tales como 2D3, que no bloquean SIRP α no provocan hemoaglutinación. Tomados juntos, los anticuerpos de la invención (por ejemplo, el anticuerpo 2A1 y sus derivados humanizados) son únicos entre los anticuerpos existentes CD47 en su capacidad de bloquear SIRP α , pero no provocar hemoaglutinación.

[00244] Se vuelve a proporcionar un alto rango de concentración de anticuerpos CD47 seleccionados en el ensayo de hemoaglutinación (Figura 4D). Este ensayo revela un efecto de pro-zona de hemoaglutinación por B6H12 y 9E4, en donde la hemoaglutinación se reduce en extremos altos y bajos del rango de concentración probado. La representación gráfica del índice de

hemoaglutinación también destaca el efecto pro-zona. El efecto pro-zona también es evidente en la Figuras 4C y 4E. Es importante destacar que, los anticuerpos CD47 2A1 y 2A1 quimérico carecen de actividad de hemoaglutinación en todas las concentraciones.

5

[00245] Como se muestra en la Figura 4E, el anticuerpo 1B4 de murino exhibe un rango reducido de hemoaglutinación.

[00246] Se proporciona adelante la región de cadena VH del anticuerpo 1B4.

10

```
QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFDYYIHVVKQRPQGQLEWIGWIYPGSGNTKYNERFKGKATLTVAT
SSSTAYMQLSSLTSEDVAVYFCARREEDYFDYWGQGLTVTV (SEQ ID NO: 80)
```

[00247] Se proporciona adelante la región de cadena VL del anticuerpo 1B4.

15

```
DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLYSSNQKNYLIWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSG
TDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 81)
```

20

[00248] Se prueban como anteriormente la capacidad de hemoaglutinación de los anticuerpos humanizados derivados del 2A1 de murino. Es importante destacar que, el anticuerpo AB6.12 humanizado epresentativo en numerosos isotipos IgG humanos (IgG1, IgG4-S228P, y IgG4-S228P/L235E) no provoca ninguna hemoaglutinación de RBC. Se incluyen 2A1 y 2A1-xi como controles para anticuerpos sin hemoaglutinación, mientras que B6H12 y 9E4 se incuban como controles positivos para hemoaglutinación (Figura 4F).

25

EJEMPLO 6: Unión a Macaco de Java CD47

[00249] Se evalúa la capacidad de 2A1 de murino para unirse a CD47 de macaco de Java (cino). Se ha reportado previamente que el anticuerpo B6H12 tiene una reacción cruzada con cino CD47 y se utiliza como un control positivo para la presencia en cino CD47 en el ensayo. El experimento para medir la unión de 2A1 a macaco de Java CD47 se designa para comparar la unión de 2A1 a CD47 en células B de macaco de Java y células humanas, en donde la estirpe de célula Raji se utiliza como un célula positiva a CD47 humano. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica de macaco de Java (PBMCs) se aíslan de sangre de macaco de Java completa mediante centrifugación de gradiente ficoll-paque. Se etiquetan células B de macaco de Java y humanas (Raji) con el anticuerpo de CD20 humano de atumumab (Arzerra) a 10 µg/ml, y se hace reaccionar con una serie de dilución de anticuerpo CD47 murino 2A1 o B6H12. Las células B etiquetas con anticuerpo CD20 humano se detectan con anticuerpo anti-humano policlonal conjugado a DyLite 649, mientras que los anticuerpos de murino CD47 se detectan con anticuerpo anti-ratón policlonal conjugado a DyLite 488. Las células se analizan por citometría de flujo, primero encerrado en células vivas mediante FSC y SSC, luego sobre células positivas para FL4 (CD20 positivo), y por último se mide la FL1 mediana (CD47 positivo). Los datos se normalizan al dividir la señal en cada concentración por la señal máxima para cada anticuerpo en cada población de células. Los resultados normalizados mostrados en la Figura 5 revelan que la 2A1 no reaccionan de forma cruzada con cino CD47 y tiene afinidad idéntica cuando se compara con CD47 humano. Consistente con los resultados presentados anteriormente, el B6H12 tiene menor afinidad para CD47 de superficie celular en ambas células B Raji

y macaco de Java en comparación con anticuerpos de la presente invención.

EJEMPLO 7: Generación de Anticuerpo quimérico

5 [00250] Con el fin de identificar las secuencias de las regiones variables de la cadenas pesada (VH) y liviana (VL) del anticuerpo 2A1 de murino, se aísla ácido ribonucleico (ARN) desde el hibridoma y se utiliza en reacción de cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) (Phusion RT-PCR Kit Thermo Scientific) para generar primero cADN de hebra. Un conjunto
10 cebador degenerativo que cubre el repertorio completo de murino de secuencias líderes de anticuerpos de VH y VL se utiliza en un PCR en donde el primer cADN de hebra sirve como la plantilla.

15 [00251] Se proporcionan adelante cebadores directos (líder IgG de murino).

Nombre	Secuencia
VH1-1	CACTGCAGGTRTCCACTCC (SEQ ID NO : 82)
20 VH1-2	CATAGCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO : 83)
VH1-3	CRC TACAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO : 84)
VH1-4	GCYACAGMTGTCCACTCC (SEQ ID NO : 85)
VH1-5	CACTGCAGGTGTCCWMTCC (SEQ ID NO : 86)
VH1-6	CRCTRCAGGTGTKCACTCC (SEQ ID NO : 87)
25 VH1- 7	GCTAWMGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 88)
VH1- 8	CCTCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 8 9)
VH1- 9	GCTACAGGTGCTCACTCC (SEQ ID NO: 90)
VH1- 10	CACTGCAGGTGTCCCTCTCT (SEQ ID NO: 91)
VH1- 11	CAYTGCAGGTGTCCAYTGC (SEQ ID NO: 92)

	VH1- 12	GCTAMMGGTGTCCACTTC (SEQ ID NO: 93)
	VH1- 13	CTCCTGTCAKTAACKCAGGT (SEQ ID NO: 94)
	VH1- 14	CAACTGCAGGTGTCTCTCT (SEQ ID NO: 95)
	VH1- 15	CRCTRCAGGYGTCCACTCT (SEQ ID NO: 96)
5	VH2- 1	CCAAGCTGTATCCTTTCC (SEQ ID NO: 97)
	VH2- 2	CCAAGCTGTGTCCTRTCC (SEQ ID NO: 98)
	VH3- 1	CTTGACAGYCVTTCKGGT (SEQ ID NO: 99)
	VH3- 2	CTTCACAGCCTTTCCTGGT (SEQ ID NO: 100)
	VH4	CTTAAAAGGGGTCCAGTGT (SEQ ID NO: 101)
10	VH5- 1	CAYTTTAAAARGTGTCMAGTGT (SEQ ID NO: 102)
	VH5- 2	GTTTTAAAAGGTGTCCTGTG (SEQ ID NO : 103)
	VH6	CTYTTAAAAGGKGTCAGWG (SEQ ID NO : 104)
	VH7- 1	CYTTTAMATGGTATCCAGTGT (SEQ ID NO: 105)
	VH7- 2	CTTTTACATGGTTTCAAGTGT (SEQ ID NO: 106)
15	VH8	GTCCCTGCATATGTCYT (SEQ ID NO: 107)
	VH9	GATGGCAGCWGCYCAAAG (SEQ ID NO: 108)
	VH10	CTATCAAGGTGTGCATTGT (SEQ ID NO: 109)
	VH11	CTTTTAAAAGWTGTCCAGKGT (SEQ ID NO: 110)
	VH12	GTGACAGTCCTTCCTGGTAG (SEQ ID NO : 111)
20	VH14	CTTCCTGATGGCAGTGGTT (SEQ ID NO: 112)
	VH15	GCTACAGGTATCCAATCC (SEQ ID NO: 113)

Se proporciona adelante el cebador inverso (IgG murino constante).

25

Secuencia

HC-Rev GCGTCTAGAAYCTCCACACACAGGRRCCAGTGGATAGAC (SEQ ID NO: 114)

[00253] Se proporcionan adelante cebadores directos (líder IgKappa de murino).

	Nombre	Secuencia
5	VK1-1	CTGWTGTTCTGGATTCCTG (SEQ ID NO: 115)
	VK1-2	GGTCAGACAGTCAGCAGT (SEQ ID NO: 116)
	VK2	GTGCTCTGGATTCGGGAA (SEQ ID NO: 117)
	VK4/5-1	CAGCTTCYTGCTAATCAGTG (SEQ ID NO : 118)
	VK4/5-2	CTAATCAGTGCTTCAGGA (SEQ ID NO: 119)
10	VK8-1	GTGGGTATCTGGTRCSTGTG (SEQ ID NO : 120)
	VK8-2	GGAAATTTAAAAGTACCTGTGGG (SEQ ID NO: 121)
	VK9A/9B- -1	GGTTTCMAGGTRCCAGATGT (SEQ ID NO : 122)
	VK9A/9B- -2	CTCTGGTTYCCAGGTATC (SEQ ID NO: 123)
	VK10	CTGTTTTCAAGGTRCCAGATGT (SEQ ID NO: 124)
15	VK11	GTTGTAATGTCCAGAGGA (SEQ ID NO: 125)
	VK12/13- -1	CTTACAGGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 126)
	VK12/13- -2	CTCAATTGTAGRTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 127)
	VK12/13- -3	CACAGTAGGTGTCAGATGT (SEQ ID NO: 128)
	VK12/13- -4	GTCGTAGTTGTCAGATGT (SEQ ID NO: 129)
20	VK12/13- -5	CCTCCTTCTTGGCCAAGA (SEQ ID NO: 130)
	VK19/28- -1	CTTATATGGAGCTGATGGG (SEQ ID NO: 131)
	VK19/28- -2	GTGTCTGGTGCTCATGGG (SEQ ID NO: 132)
	VK19/28- -3	CTSTGGTTGTCTGGTGTTGA (SEQ ID NO: 133)
	VK20	GTCTCTGATTCTAGGGCA (SEQ ID NO: 134)
25	VK21-1	CTKCKCTGGGTTCCAG (SEQ ID NO: 135)
	VK21-2	GCAGGTGTTGACGGA (SEQ ID NO: 136)
	VK22-1	CAGGTGCCTCGTGAC (SEQ ID NO: 137)
	VK22-2	CTCTGGTGCCTGTGCA (SEQ ID NO: 138)
	VK23	CTGGAYTYCAGCCTCCAGA (SEQ ID NO: 139)

VK24/25-1 GWTCTCTRGAGTCAGTGGG (SEQ ID NO: 140)

VK24/25-2 CTGAATCCCTGGAKCYACT (SEQ ID NO: 141)

VK32 GTTCTGCTTTTTAGGTGTG (SEQ ID NO: 142)

VK33/34 GATCCCAGGCATGATATGT (SEQ ID NO: 143)

5 VK31/38C CTTTCATGGTGCTCAGTGT (SEQ ID NO: 144)

VKRF CCATATCAGGTGCCCAGTGT (SEQ ID NO: 145)

[00254] Se proporciona adelante el cebador inverso (IgKappa de murino constante).

10

Nombre	Secuencia
LC -rev	GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG (SEQ ID NC 146)

[00255] Se clonan posteriormente VH y VL en la estructura en los
15 vectores que contienen secuencias de secreción de anticuerpo apropiadas y regiones constantes de IgG1 humano y Igkappa, respectivamente, para generar construcciones de ADN quimérico de murino: humano. Estas construcciones se co-transfectan en células 293Freestyle (Life Technologies) y el anticuerpo resultante se
20 purifica a partir del sobrenadante de cultivo celular mediante cromatografía de Proteína A. Para determinar que se han identificado las secuencias de VH y VL correctas, el 2A1 quimérico (denota 2A1-xi) se compara con el anticuerpo 2A1 parenteral de murino y ensayo de unión de CD47 mediante
25 citometría de flujo sobre células Raji (Figura 6). También se incluye B6H12 como un control positivo en este ensayo. El 2A1-xi unido se detecta utilizando un anticuerpo secundario IgG anti-humano conjugado a FITC. El 2A1 unido y B6H12 se detectan

utilizando un anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado a FITC. Se determinan las afinidades aparentes mediante ajustes no lineales (Software Prism Graphpa) de mediana de intensidades de fluorescencia mediana en varias concentraciones de anticuerpo (Tabla 2). El anticuerpo 2A1-xi tine una afinidad de unión que el anticuerpo 2A1 de murino hacia CD47 de superficie celular, demostrando que se han identificado de forma apropiada las secuencias VH y VL.

10 **Tabla 2**

	KD(aparente) (pM)	Error Estándar	R ²
2A1-mlgG1	93.6	± 10.1	0.9977
2A1-xi	78	± 14.9	0.9922
B6H12	3786	± 310	0.9998

EJEMPLO 8: Humanización de Anticuerpo

[00256] El anticuerpo CD47 2A1 de murino se humaniza para reducir el potencial de la inmunogenicidad cuando se administra a un paciente humano. Las secuencias de la región VH y VL se 2A1 se comparan con secuencias de anticuerpo humanas en el banco de datos de IMGT. Posteriormente se genera un modelo estructural de las regiones VH y VL de 2A1 utilizando las estructuras conocidas de los anticuerpos humanos y humanizados relacionados más cercanamente en el Banco de Datos de Proteína (PDB). Las 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR) en ambas cadenas pesada y liviana del anticuerpo 2A1 se fijan y las estructuras de murino se reemplazan con numerosas estructuras humanas que tienen la más alta posibilidad de mantener la

orientación apropiada de las CDR. Se generan construcciones que corresponden a cada una de las variantes 2A1 humanizadas mediante síntesis de gen y se clonan en el marco en vectores que contienen una secuencia de secreción apropiada y regiones constantes de IgG1 humano y Igkappa. Se contranfectan varias combinaciones de cadenas pesada y liviana humanizadas en células 293Freestyle (Life Technologies), y se purifican los anticuerpos resultantes del sobrenadante del cultivo celular mediante cromatografía de Proteína A.

[00257] Se prueban los anticuerpos humanizados para su capacidad de unirse a células Raji mediante citometría de flujo (Figura 7). El anticuerpo 2A1-xi se utiliza como un control en la mayoría de estos ensayos para establecer el punto de referencia para afinidad de unión. Los anticuerpos humanizados se optimizan adicionalmente para mejorar la expresión y reducir los sitios problemáticos que incluyen isomerización potencial y sitios de desamidación. Un ejemplo de un anticuerpo humanizado optimizado derivado del anticuerpo 2A1 de murino se denota como anticuerpo AB6.12, que exhibe afinidad de unión muy similar como el anticuerpo 2A1-xi (Figura 7H; Tabla 3). Se determinan las afinidades aparentes mediante ajustes no lineales (Software Prism Graphpad) de la mediana de intensidades de fluorescencia en varias concentraciones de anticuerpo.

Tabla 3.

	KD(aparente) (pM)	Error Estándar	R2
--	-------------------	-------------------	----

2A1-xi	36.4	±8.54	0.9908
AB6.12	39.9	±5.54	0.9964

[00258] El anticuerpo AB6.12 posteriormente se convierte de un IgG1 a otros isotipos IgG humanos al reemplazar el dominio constante de la cadena pesada. Como se muestra en la Figura 71, 5 cambiar el isotipo IgG a una versión estabilizada de bizagra de IgG4 (IgG4P: S228P), y reducir la variante de unión del receptor Fc del IgG4 estabilizado (IgG4PE: S228P/L235E) no altera la afinidad de unión del anticuerpo humanizado hacia el CD47 de superficies celulares (Figura 71; Tabla 4). Se determinan las 10 afinidades aparentes mediante ajustes no lineales (Software Prism Graphpad) de la mediana de intensidades de flurecencia en varias concentraciones de anticuerpo.

Tabla 4.

	KD(aparente) (pM)	Error Estándar	R ²
AB6.12-IgG1	38.6	±10.5	0.9798
AB6.12-IgG4P	35.7	±8.4	0.9841
AB6.12-IgG4PE	34.6	±10.9	0.9727

15
[00259] A través del proceso de humanización, los anticuerpos CD47 se prueban para asegurar que la funcionalidad de bloqueo de SIRP α está intacta. Como se muestra en la Figura 7J, los isotipos IgG múltiples del anticuerpo humanizado, el AB6.12, bloquea la 20 interacción SIRP α :CD47, utilizando el método con base en citometría de flujo descrito anteriormente en el Ejemplo 3. Los

anticuerpos CD47 de ejemplo y la región de VH y VL correspondiente incluyen aquellos proporcionados en la Tabla 1.

[00260] Durante el proceso de humanización, se determina que en algunas realizaciones, un motivo de secuencia de aminoácidos, "NA," al inicio de la CDR3 de VH (SEC ID NO: 52 o SEQ ID NO: 77) es importante para la unión de los anticuerpos CD47 descritos aquí. En algunas realizaciones, en la ausencia de residuos de aminoácidos "NA" al inicio de CDR3 de VH (SEC ID NO: 52 o SEQ ID NO: 77), los anticuerpos CD47 de la invención no se unen a su objetivo o se unen a su objetivo con menor afinidad de lo que lo harían en la presencia de residuos de aminoácidos "NA". Por ejemplo, cuando el motivo "NA" se cambia a motivos más canónicos de "AR" o "AT", la unión se reduce sustancialmente (es decir, mayor de diez veces). En otras realizaciones, en la ausencia de residuos de aminoácidos "NA" al inicio de CDR3 de VH (SEC ID NO: 52 o SEQ ID NO: 77), los anticuerpos CD47 de la invención se unen a su objetivo con una afinidad equivalente en comparación con la unión en la presencia de residuos de aminoácidos "NA".

[00261] Aquellos expertos en la técnica reconocerán que es posible determinar, sin experimentación indebida, si una sustitución de aminoácidos en las secuencias de los anticuerpos CD47 de la invención resultará en un anticuerpo con sustancialmente la misma función, por ejemplo, un anticuerpo CD47 con la capacidad de bloquear SIRP α y no provocar un nivel significativo de hemoaglutinación.

[00262] Una imagen de la traza de cromatografía de exclusión por tamaño utilizando un FLPC AKTA con una columna Superdex200 se muestra en la Figura 8A. Se muestran las variantes IgG1, IgG4P, e IgGPE del anticuerpo AB6.12. Todas las tres variantes son más del 98% monoméricas. La Figura 8B es una fotografía de un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de numerosas variantes humanizadas de 2A1 bajo condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR).

10 **EJEMPLO 9:** Los anticuerpos CD47 promueven la Fagocitosis de Estirpes Celulares Tumorales

[00263] El CD47 es un receptor de superficie celular que se regula de forma ascendente en células tumorales y también se considera que contribuye a la evasión inmune a través de su interacción con su ligando natural SIRP α . El ligado de CD47 a SIRP α en macrófagos resulta en actividad fagocítica reducida. Como se describe en detalle adelante, se determina si la unión de CD47 y la actividad de bloqueo de SIRP α del anticuerpo 2A1, y variaciones de los mismos, promueven fagocitosis de las células tumorales en presencia de macrófagos humanos.

[00264] Se aíslan PBMC a partir de sangre humana, y los monocitos se diferencian en macrófagos al incubarlos en medio AIM-V (Life Technologies) durante 7 días. Estos macrófagos derivados de monocitos (MDM) se vuelven adherentes lo que permite que otras células sean lavadas. Los MDM se raspan y se vuelven a colocar en placas de 12 pozos y se dejan adherir durante 24 horas. La estirpe celular de tumor humano CCRF-CEM se selecciona como un tipo de célula objetivo debido a su alta expresión de CD47. Las

células CCRF-CEM se etiquetan con 0.3 μ M de CFSE a 37 ° C durante 15 minutos, luego se lava y se agrega a MDM en una relación de 4:1 de células tumorales por fagocitos, y el anticuerpo CD47 se agrega a diversas concentraciones. La fagocitosis de las células objetivo se deja durante 3 horas. Posteriormente, las células objetivo no fagocitadas se lavan con PBS. Los fagocitos restantes se raspan, se tiñen con un anticuerpo para el marcador de macrófagos CD14 conjugado con DyLite 649 (Biolegend), y se analizan mediante citometría de flujo. La fagocitosis se mide al seleccionar células vivas que son FL4 positivos (CD14 +), y luego evaluar el porcentaje de células positivas FLL (CFSE +).

[00265] La Figura 9 muestra que el anticuerpo CD47 2A1 y sus variantes humanizadas demuestran un aumento dependiente de dosis en la fagocitosis de las células tumorales mediante MDM. El anticuerpo 2A1 y la variante humanizada AB2.05 son únicos en su capacidad de inducir la fagocitosis de células tumorales a 66.7 pM, mientras que el B6H12 no tiene actividad en esa concentración (Figura 9A). La Figura 9B muestra cómo 2A1, y las variantes humanizadas AB2.05, AB6.12-IgG1, AB6.12-IgG4P y AB6.12-IgG4PE todos inducen la fagocitosis máxima a 0.3 μ g/ml o 2 nM, mientras que el B6H12 requiere mayores concentraciones. Estos datos demuestran que el anticuerpo CD47, 2A1 (y variantes humanizadas derivadas del mismo), inducen fagocitosis mediada por macrófagos de las células tumorales positivas de CD47. En este ejemplo, las células CCRF-CEM se utilizan como la célula objetivo positiva CD47.

EJEMPLO 10: Actividad Antitumoral de Anticuerpos CD47

[00266] Se evalúa la actividad anti-tumoral de los anticuerpos CD47 murino en un modelo de linfoma Raji. Se implantan células Raji subcutáneamente en ratones NOD/SCID, y asignan aleatoriamente en 5 grupos (10 ratones por grupo, el día 0).

5 Grupo 1: Vehículo (sólo regulador); Grupo 2: B6H12 (control positivo); Grupo 3: 1B4; Grupo 4: 2A1; y Grupo 5: 9E4. Se inicia tratamiento con cada anticuerpo o vehículo (solo regulador) cuando los tumores son palpables (50 mm³, día 13) y se les hace eutanasia a los ratones cuando los volúmenes de los tumores

10 alcanzan ~1500 mm³. Se miden volúmenes del tumor 3 veces por semana. Los anticuerpos se dosifican intravenosamente (IV) con 200 µg 3 veces por semana durante 3 semanas (9 dosis totales por ratón). El tratamiento se inicia el día 13 y finaliza el día 32.

15 [00267] Como se muestra en la Figura 10A, los anticuerpos CD47 de la invención, particularmente el anticuerpo 2A1, demuestra actividad anti-tumoral en este modelo animal de linfoma. Para alcanzar un volumen de tumor de 1500 mm³, el Grupo 1 (solo vehículo) requiere ~25 días; el Grupo 2 (B6H12.2) requiere ~45

20 días; el Grupo 3 (1B4) requiere ~37 días; el Grupo 4 (2A1) requiere ~85 días; y el Grupo 5 (9E4) requiere ~40 días para alcanzar un volumen de tumor de ~1500 mm³. Estos datos indican que el anticuerpo 2A1 es significativamente más potente que todos los anticuerpos de unión a CD47 probados, que incluyen B6H12 que

25 se sabe se une CD47, bloquea la interacción CD47 con SIRP α , y suprime la formación de tumores en modelos de ratón de cáncer humano. Inesperadamente, la actividad de supresión de tumores de estos anticuerpos CD47 no se correlaciona con su potencia de

unión a CD47 o bloqueo de la interacción CD47 con SIRP α , que se esperaría en base a los datos publicados.

[00268] Como se describe en los Ejemplos 2 y 3, 2A1, 1B4, y 9E4
5 tienen una afinidad similar para CD47 y una potencia similar para
bloquear la interacción CD47 con SIRP α . Adicionalmente, la
eficacia mejorada de 2A1 no se puede explicar por las diferencias
en el dominio Fc de los anticuerpos descritos ya que todos los
anticuerpos utilizados en este estudio están compuestas de
10 dominios IgG1 de ratón idénticos. de esta manera, adicionalmente
a la composición única de materia, el anticuerpo 2A1 posee
características inesperadas y únicas, que incluyen la incapacidad
para inducir interacciones homotípicas entre las células que
expresan CD47, *por ejemplo*, los glóbulos rojos de la sangre, y
15 una actividad de supresión de tumores mejorada que no se pueden
explicar por una unión mejorada a CD47 o capacidad mejorada para
bloquear la interacción CD47 con SIRP α .

[00269] Para confirmar que los anticuerpos 2A1 humanizados
20 mantienen su actividad anti-tumoral, se realiza un estudio
similar de tumores Raji. El diseño del estudio es el mismo que el
descrito anteriormente. Se implantan células Raji subcutáneamente
en ratones NOD/SCID y se asignan aleatoriamente en 5 grupos (10
ratones por grupo, el día 0). En este estudio, los anticuerpos se
25 dosifican intraperitonealmente (IP) con 200 μ g 3 veces por semana
durante 3 semanas (9 dosis totales por ratón), y se miden los
volúmenes tumorales 3 veces por semana. Sin embargo, para este
estudio, el anticuerpo 2A1 IgG1 de ratón (grupo 2) se compara con
un derivado humanizado, AB6.12. Para este estudio, se construye

el AB6.12 (como se describe en el EJEMPLO 8) en IgG1 humano (Grupo 3), IgG4P humano (Grupo 4) y IgG4PE humano (Grupo 4). de esta manera, este experimento se diseña para superar la influencia de humanización de 2A1 en su actividad de supresión de tumor y el papel potencial de la función efectora de dominio Fc que se conoce en la técnica contribuye con las actividades antitumorales de muchos anticuerpos. Se ha documentado bien que el IgG1 humano posee significativamente más función efectora en comparación con IgG4P humano. El IgG4PE se desarrolla para reducir adicionalmente la función efectora. Como se puede ver en la Figura 10B, la humanización de 2A1 no disminuye la actividad antitumoral de 2A1, y de hecho puede haberla mejorado. El AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P, y AB6.12-hIgG4PE todos muestran actividad anti-tumoral similar que parece significativamente mayor que la del 2A1 de ratón (2A1mIgG). Este resultado es inesperado, ya que el 2A1mIgG1, AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P y AB6.12-hIgG4PE tienen actividades de unión a CD47 y bloqueo de SIRP α similares. Adicionalmente, ya que AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P y AB6.12-hIgG4PE tienen actividades antitumorales similares, parece que la función efectora cumple una función en la eficacia del anticuerpo 2A1 AB6.12 humanizado.

Ejemplo 11: Co-cristalización de anticuerpos CD47 con CD47

[00270] La CD47 es una proteína de transmembrana de paso 5 con un único dominio extracelular IgV (tipo variable similar a inmunoglobulina) que se glicosila altamente en 6 sitios. La estructura del dominio de CD47-IgV se ha resuelto en el complejo con el dominio IgV de SIRP α , su ligando natural (Banco de Datos de Proteína (PDB) No. de Referencia 2JJS; Hatherley et al., 2008

Mol Cell, 25; 31 (2): 266-77 (Figura 11A)). La estructura muestra que el SIRP α -IgV se une a CD47-IgV en un epítipo apical que incluye el piroglutamato de terminal N de CD47. Esta estructura explica de forma suficiente cómo ambas proteínas de transmembrana de superficie celular pueden interactuar de manera productiva a partir de células adyacentes en una orientación cabeza a cabeza. La estructura cristalográfica de rayos X de CD47-IgV en complejo con el B6H12 Fab se presenta en la Figura 11B. Para mayor claridad, las regiones constantes de los Fab (CH1 y CL) se omiten en la Figura, y sólo se presenta el Fv (VH y VL). Esto revela un sitio de unión apical, el posicionamiento de este anticuerpo sobre una superficie extremadamente distal de la membrana celular (Figura 11B). El mecanismo de bloqueo SIRP α mediante B6H12 es evidente a partir de esta estructura. La orientación propuesta de la ubicación relativa de la membrana celular se representa como una línea discontinua en la Figura 11.

[00271] Con el fin de determinar el epítipo objetivo de los anticuerpos de la presente invención, se determina la estructura cristalográfica de rayos X del co-complejo de dominio CD47-IgV y Fab de 2A1-xi (anticuerpo quimérico con dominios CL y CH1 humanos) (Figura 11C). Para mayor claridad, se omiten las regiones constantes de los Fab (CH1 y CL) en la Figura, y sólo se presenta el Fv (VH y VL). A diferencia de la estructura previamente determinada de CD47 que se una SIRP α en una orientación cabeza a cabeza (Figura 11 A), y el anticuerpo B6H12 se posiciona apicalmente lejos de la membrana (Figura 11B), la estructura de 2A1 en complejo con CD47 revela la unión del anticuerpo a CD47 cerca de la membrana en una cabeza inesperada y

única a la orientación lateral (Figura 11C). El epítipo 2A1 en CD47 es discontinuo, e incluye los residuos Y37, K39, K41, el bucle KGRD (SEQ ID NO: 56) (residuos 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104, y E106 de CD47 cuando se enumeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 147 (*es decir*, SEQ ID NO: 48 que excluye la secuencia de señal (aminoácidos 1 a 18)). La estructura de 2A1 unida a CD47 también revela que la VH se implica principalmente en la unión al bucle KGRD (SEQ ID NO: 56) de CD47, mientras que el dominio VK interactúa con residuos apicales que incluyen Y37, T102, y E104, que están implicados en unión a SIRP α . Por lo tanto, es principalmente el dominio VK que impide físicamente la unión de SIRP α a CD47. Estos estudios estructurales sugieren que el epítipo único 2A1 se une a esté en el lado de CD47. En contraste a los anticuerpos CD47 conocidos en la técnica, la orientación de la región VH de 2A1 en una posición proximal de la membrana son características fundamentales de este anticuerpo que evitan que un nivel significativo de hemoaglutinación de glóbulos rojos al restringir el anticuerpo de tal manera que no puede haber un puente para las moléculas CD47 en células adyacentes.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a CD47 o un
5 fragmento inmunológicamente activo del mismo, en donde el anticuerpo no provoca un nivel significativo de aglutinación de células después de administración.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo
10 es quimérico, humanizado, o completamente humano.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el CD47 es CD47 humano.
- 15 4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo evita que el CD47 interactúe con proteína α reguladora de señal (SIRP α).
5. El anticuerpo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo
20 o fragmento inmunológicamente activo del mismo promueve la fagocitosis mediada por macrófago de una célula que expresa CD47.
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo
25 o fragmento inmunológicamente activo del mismo es un isotipo IgG se selecciona del grupo que consiste de isotipo IgG1, isotipo IgG2, isotipo IgG3, y isotipo IgG4.

7. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende una región de cadena pesada variable (VH) se selecciona del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 5-30.

5

8. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende una región de cadena liviana variable (VL) se selecciona del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 31-47.

10

9. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende una región VH proporcionada en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 5-30 y una región VL proporcionada en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 31-47.

15

10. El anticuerpo de la reivindicación 9, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende una región VH proporcionada en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 5, 7, 8, 11, 12, 15-17, 20-22, y 27-30 pareadas con una región VL proporcionada en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 31, 32, 35, 40, 41, 42, 43, 44, y 47.

20

11. El anticuerpo de la reivindicación 9, en donde el anticuerpo comprende una combinación de una región de cadena VH y una región de cadena VL seleccionada de las combinaciones enumeradas en la Tabla 1.

25

12. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende una secuencia de región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de VH establecida en la SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, o SEQ ID NO: 66, una secuencia de CDR2 de VH establecida en la SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, o SEQ ID NO: 76, una secuencia de CDR3 de VH establecida en la SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 77, una secuencia de CDR1 de VL establecida en la SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67, o SEQ ID NO: 68, una secuencia de CDR2 de VL establecida en la SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, o SEQ ID NO: 71 y una secuencia de CDR3 de VL establecida en la SEQ ID NO: 55.
13. El anticuerpo de la reivindicación 12, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende una secuencia de CDR1 de VH establecida en la SEQ ID NO: 50, una secuencia de CDR2 de VH establecida en la SEQ ID NO: 51, una secuencia de CDR3 de VH establecida en la SEQ ID NO: 52, una secuencia de CDR1 de VL establecida en la SEQ ID NO: 53, una secuencia de CDR2 de VL establecida en la SEQ ID NO: 54, y una secuencia de CDR3 de VL establecida en la SEQ ID NO: 55.
14. El anticuerpo de la reivindicación 12, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende una secuencia de CDR1 de VH establecida en la SEQ

ID NO: 50, una secuencia de CDR2 de VH establecida en la SEQ
ID NO: 72, una secuencia de CDR3 de VH establecida en la SEQ
ID NO: 52, una CDR1 de VL establecida en la SEQ ID NO: 53,
una secuencia de CDR2 de VL establecida en la SEQ ID NO: 71,
5 y una secuencia de CDR3 de VL establecida en la SEQ ID NO:
55.

15. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo
se une a CD47 en una cabeza para orientación lateral, en
10 donde una cadena VH del anticuerpo se posiciona cerca de la
membrana de una célula que expresa CD47, y en donde una
cadena VL del anticuerpo ocluye un sitio de unión SIRP α
sobre CD47.

15 16. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo
se une a CD47 en una cabeza para orientación lateral, en
donde una cadena VL del anticuerpo se posiciona cerca de la
membrana de una célula que expresa CD47, y en donde una
cadena VH del anticuerpo ocluye un sitio de unión SIRP α
20 sobre CD47.

17. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo
se une a un epítipo discontinuo sobre CD47.

25 18. El anticuerpo de la reivindicación 17, en donde el
anticuerpo se une a un bucle de CD47 que comprende la SEQ ID
NO: 56.

19. El anticuerpo de la reivindicación 17, en donde el epítipo discontinuo comprende residuos de aminoácidos Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104, o E106 de CD47 cuando se enumera de acuerdo con la SEQ ID NO: 147.

5

20. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo no provoca un nivel significativo de hemoaglutinación de glóbulos rojos después de administración.

10 21. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo es un isotipo IgG seleccionado de IgG4P e IgGPE.

15 22. Un anticuerpo aislado o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, en donde el anticuerpo compite con el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para evitar que el CD47 interactúe con SIRP α .

20 23. Un polipéptido que comprende residuos de aminoácidos Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104, y E106 de CD47 cuando se enumera de acuerdo con la SEQ ID NO: 147.

25 24. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 o un fragmento inmunológicamente activo del mismo y un portador.

25. Un método para aliviar un síntoma de un cáncer u otra afección neoplásica, el método comprende administrar el

anticuerpo de la reivindicación 1 o un fragmento inmunológicamente activo del mismo a un sujeto en necesidad del mismo en una cantidad suficiente para aliviar el síntoma del cáncer o otra afección neoplásica en el sujeto.

5

26. El método de la reivindicación 25, en donde el sujeto es un humano.

10

27. El método de la reivindicación 25, en donde el anticuerpo es quimérico, humanizado, o completamente humano.

28. El método de la reivindicación 25, en donde el CD47 es CD47 humano.

15

29. El método de la reivindicación 25, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo evita que el CD47 interactúe con SIRP α .

20

30. El método de la reivindicación 25, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo es un isotipo IgG se selecciona del grupo que consiste de isotipo IgG1, isotipo IgG2, isotipo IgG3, y isotipo IgG4.

25

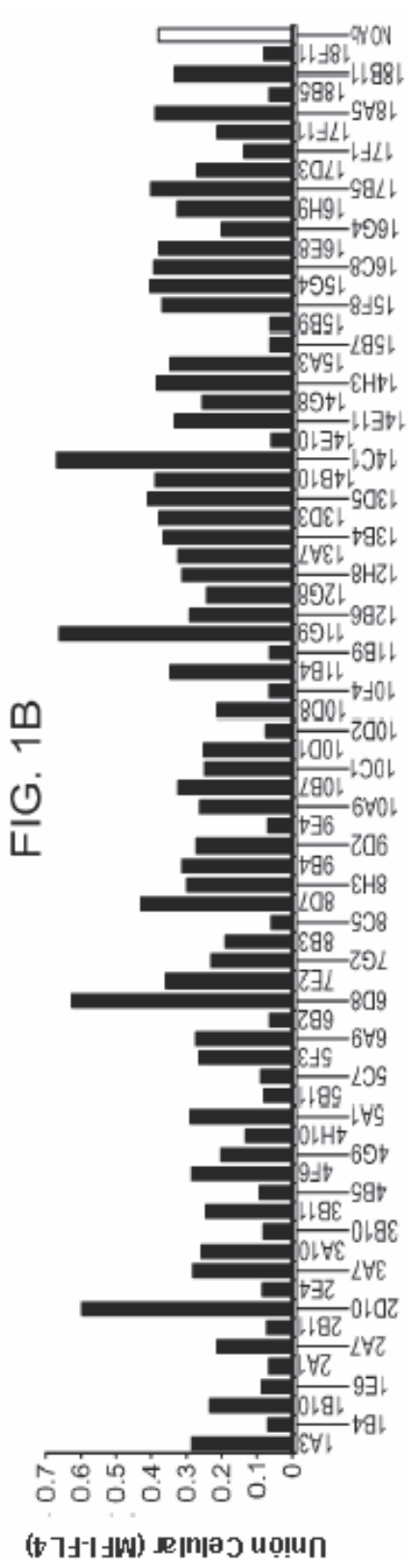
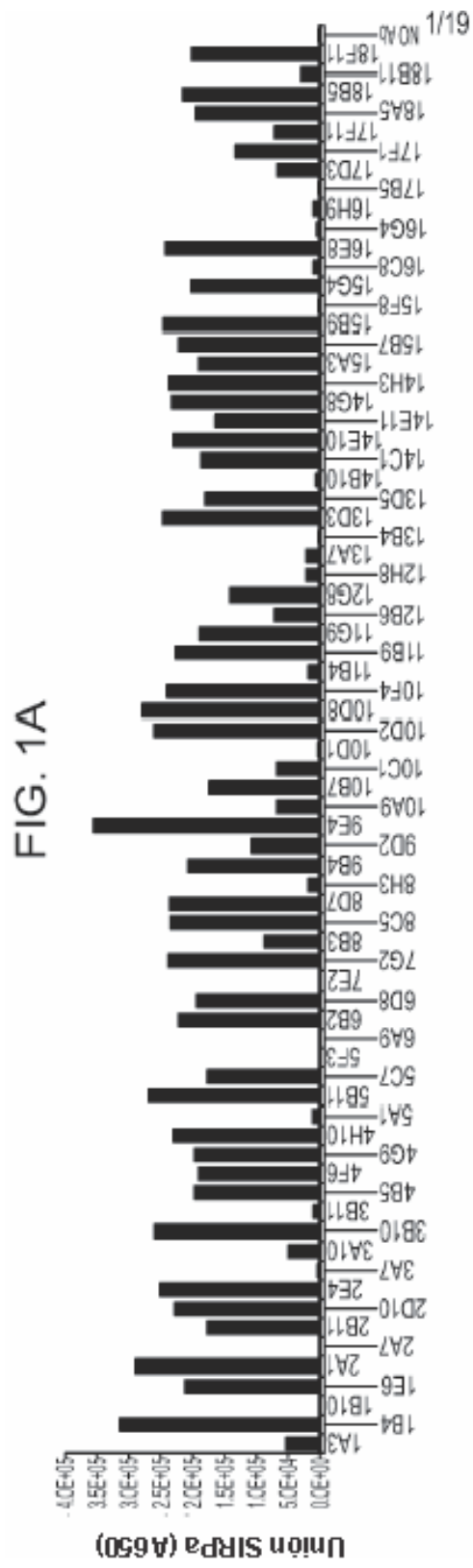
31. El método de la reivindicación 25, en donde el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo es un isotipo IgG seleccionado de IgG4P y IgGPE.

32. El método de la reivindicación 25, comprende adicionalmente administrar quimioterapia.

33. El método de la reivindicación 32, en donde dicha quimioterapia es radioterapia.

ANTICUERPOS CD47 Y MÉTODOS DE USO LOS MISMOS**RESUMEN**

5 Esta invención se relaciona de manera general con anticuerpos
monoclonales que reconocen CD47, más específicamente con
anticuerpos CD47 que no provocan un nivel significativo de
aglutinación de células, con métodos para generar estos
anticuerpos, y con métodos para utilizar estos anticuerpos
10 monoclonales como productos terapéuticos.



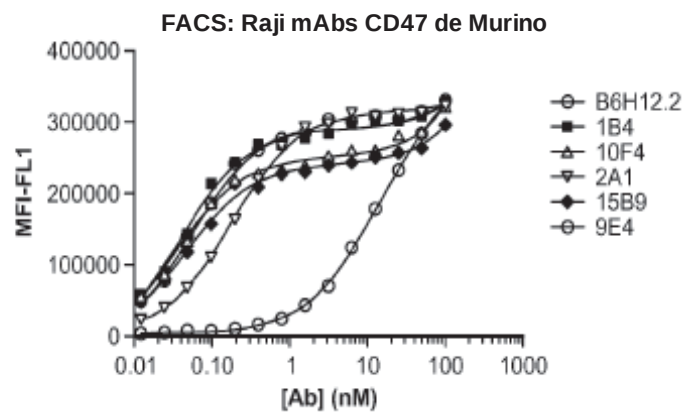


FIG. 2A

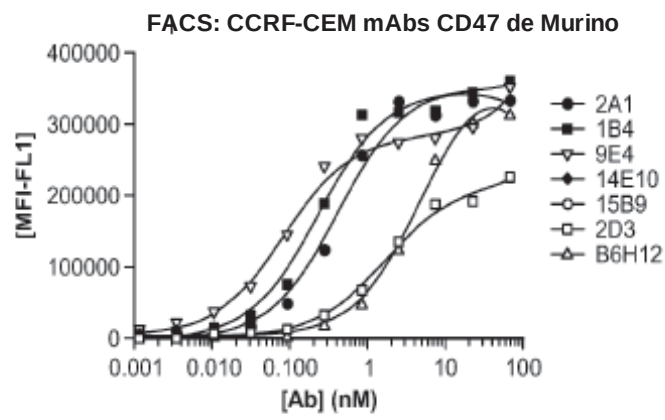


FIG. 2B

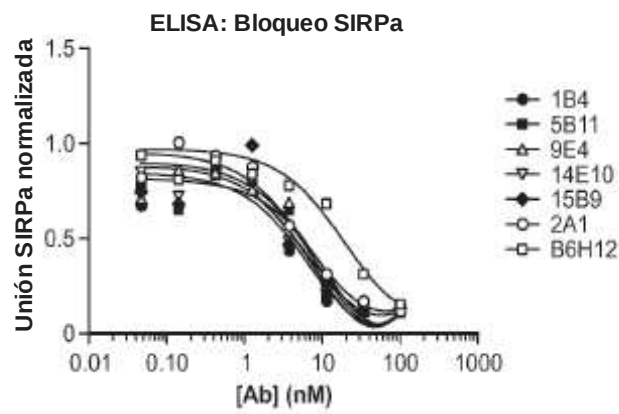


FIG. 3A

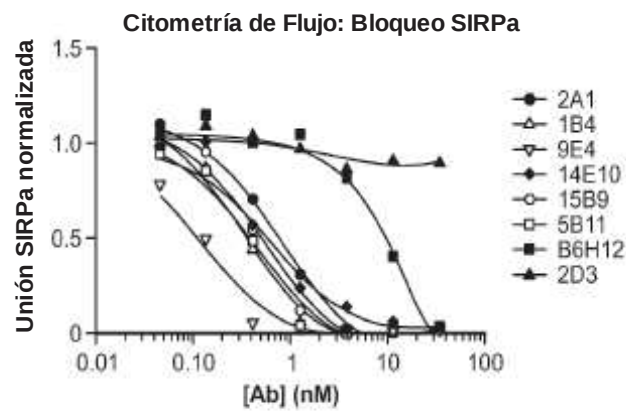


FIG. 3B

4/19

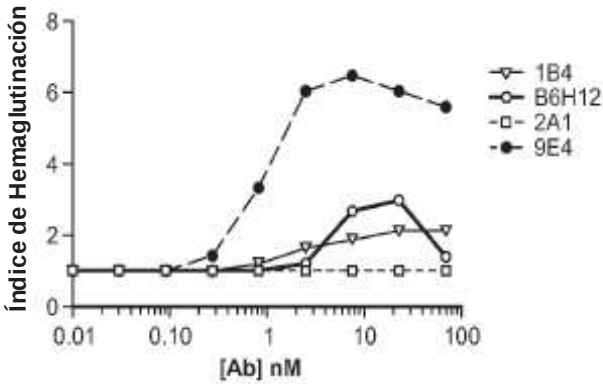
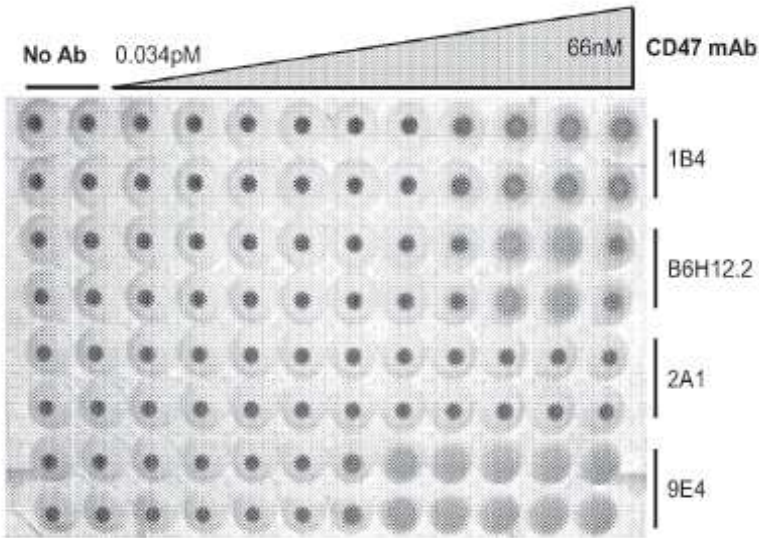


FIG. 4A

[Ab] (nM)	100	50	25	12.5	100	50	25	12.5	100	50	25	12.5
A	9E4	9E4	9E4	9E4	11B9	11B9	11B9	11B9	15B9	15B9	15B9	15B9
B	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	10F4	10F4	10F4	10F4	18F11	18F11	18F11	18F11
C	B6H12	B6H12	B6H12	B6H12	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	18B5	18B5	18B5	18B5
D	2A1	2A1	2A1	2A1	3B10	3B10	3B10	3B10	17F11	17F11	17F11	17F11
E	2A1-Xi	2A1-Xi	2A1-Xi	2A1-Xi	15B7	15B7	15B7	15B7	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
F	6B2	6B2	6B2	6B2	2B11	2B11	2B11	2B11	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
G	14E10	14E10	14E10	14E10	5B11	5B11	5B11	5B11	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
H	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

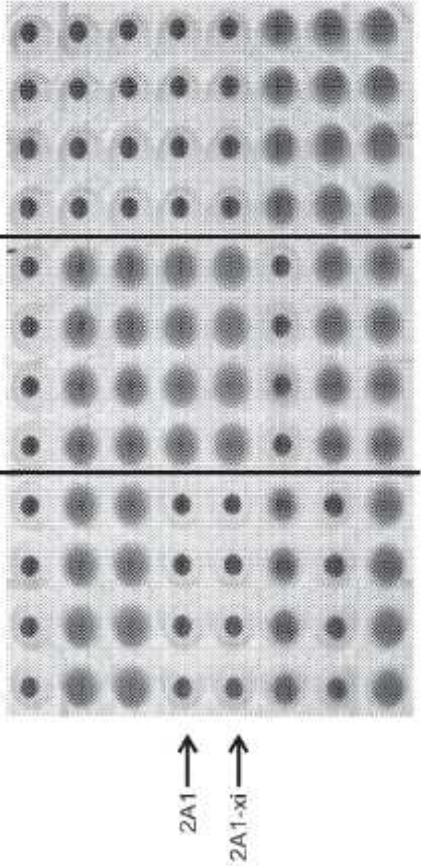


FIG. 4B

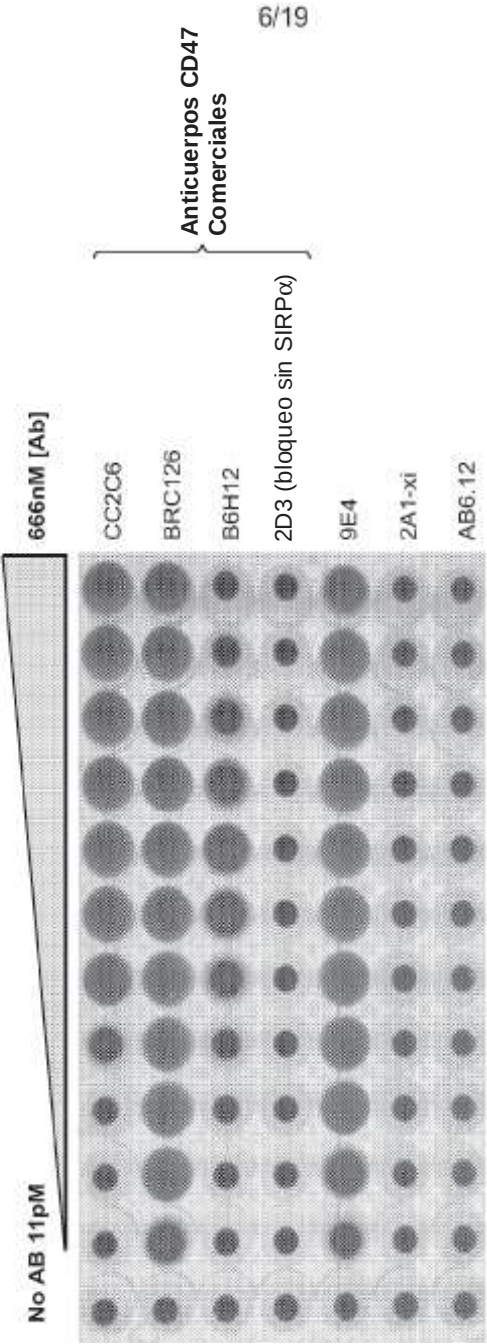


FIG. 4C

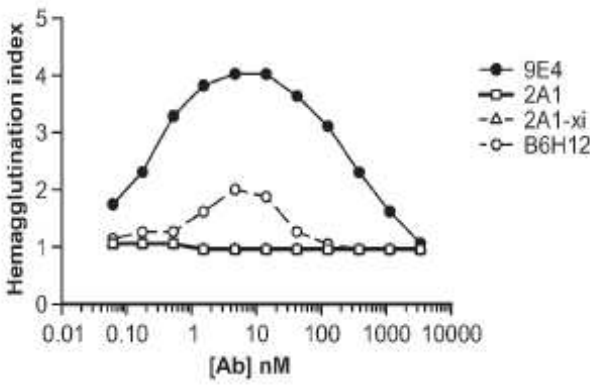
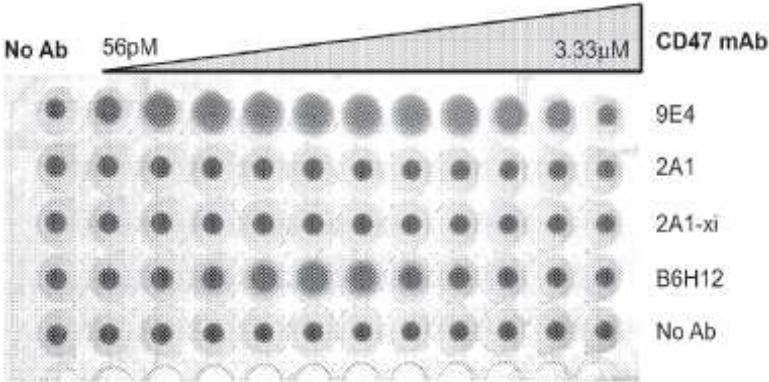


FIG. 4D

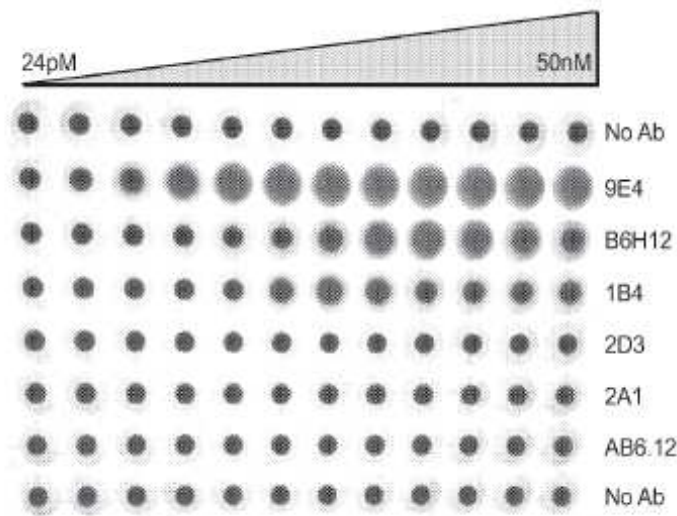


FIG. 4E

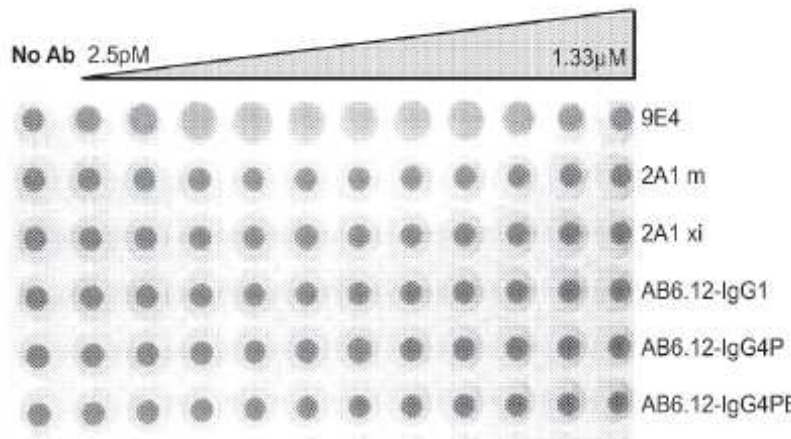


FIG. 4F

9/19

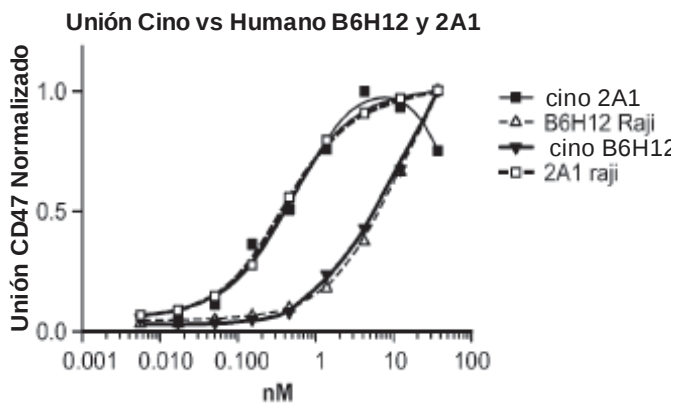


FIG. 5

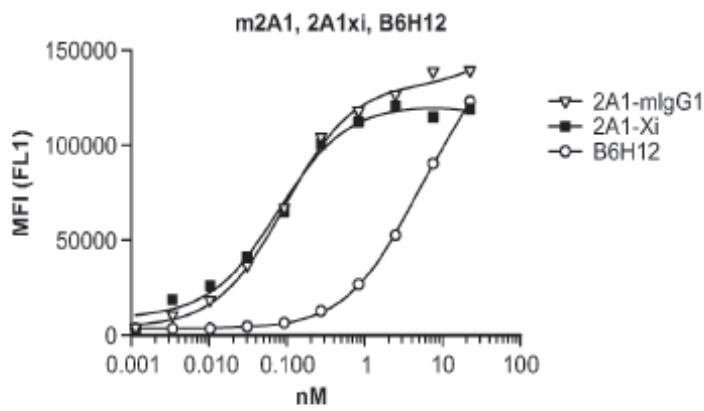


FIG. 6

FIG. 7A

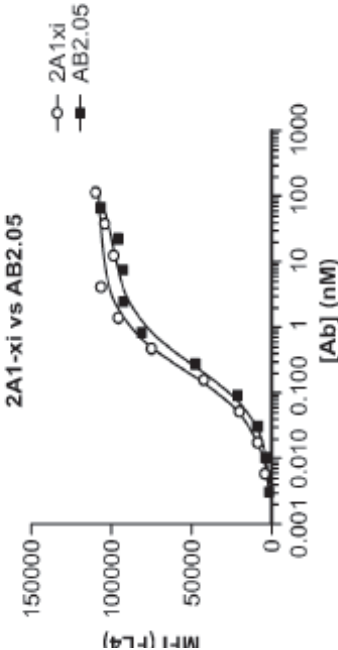


FIG. 7B

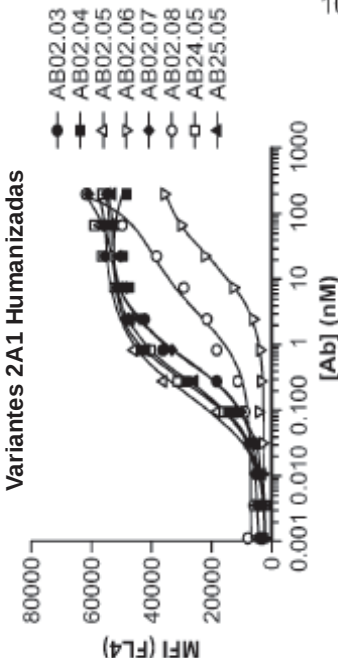


FIG. 7C

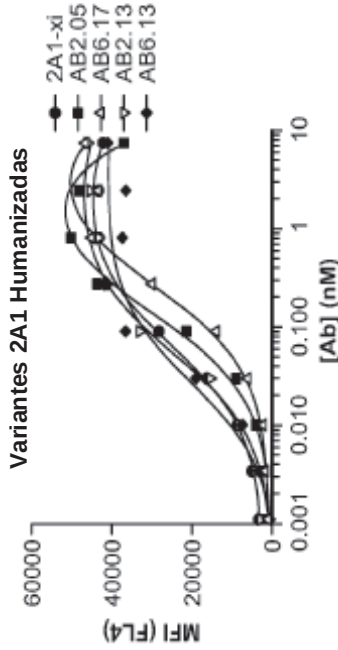
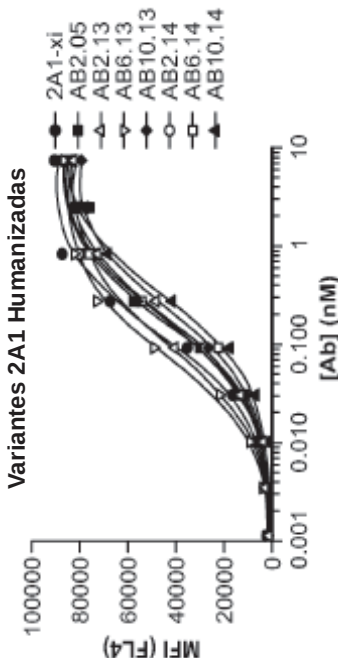
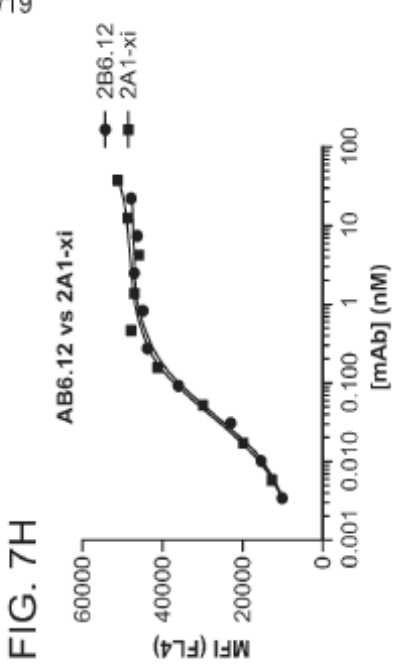
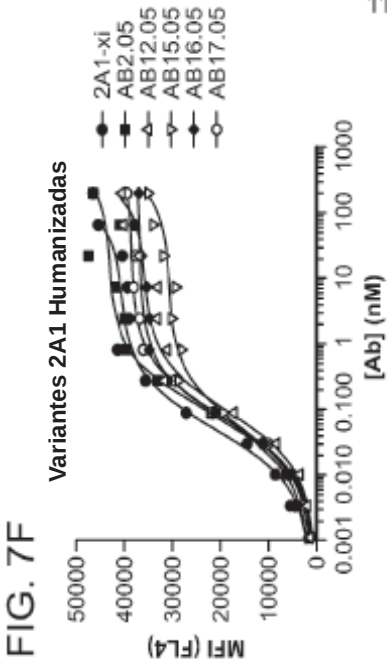
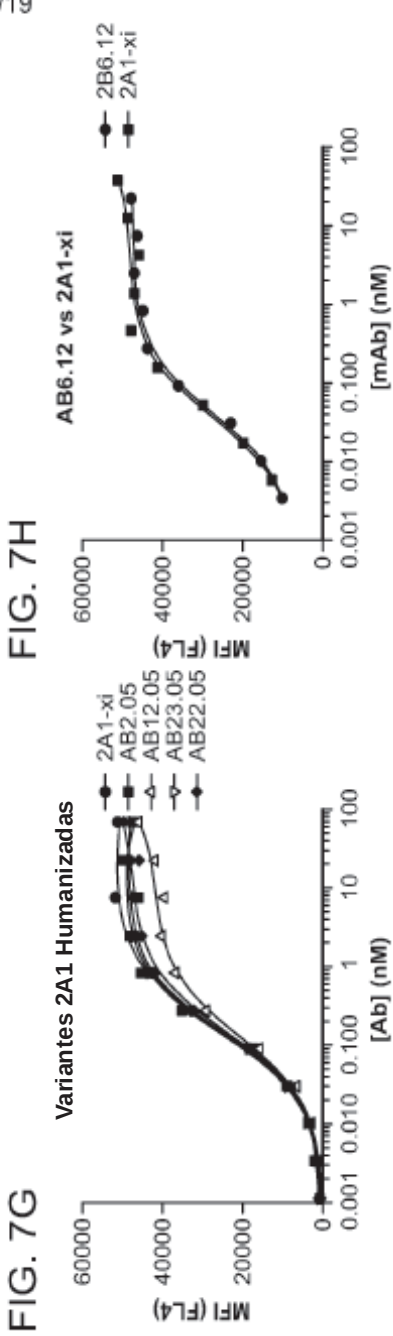
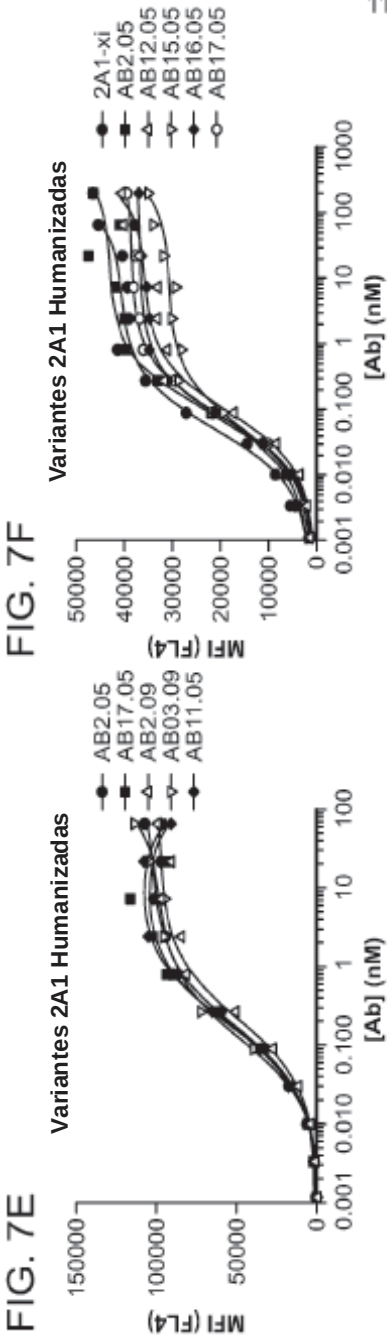


FIG. 7D





12/19

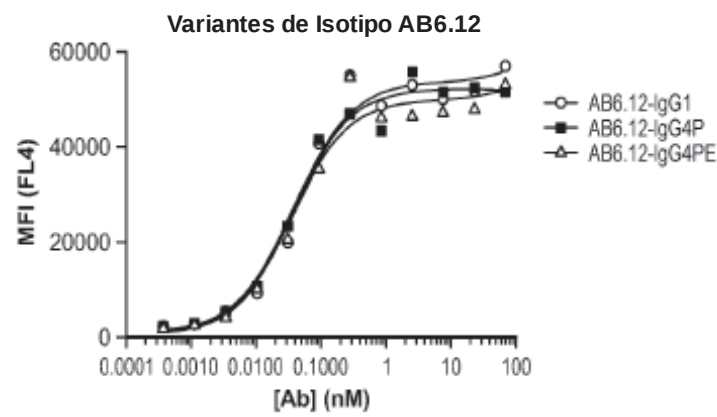


FIG. 7I

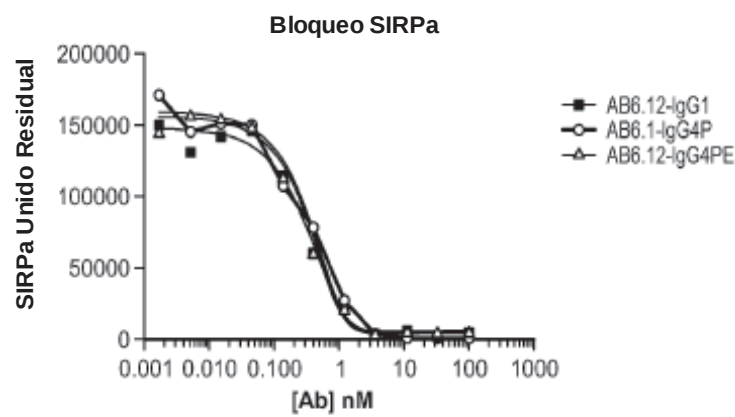
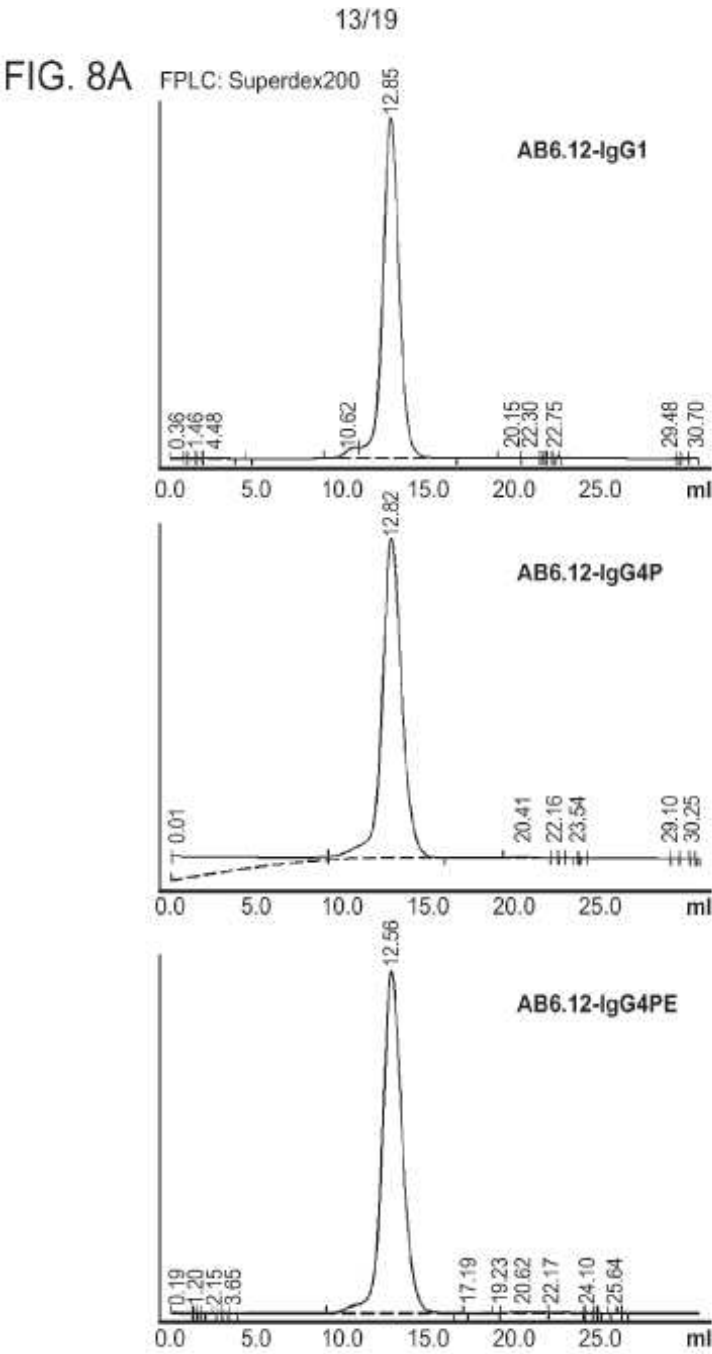


FIG. 7J



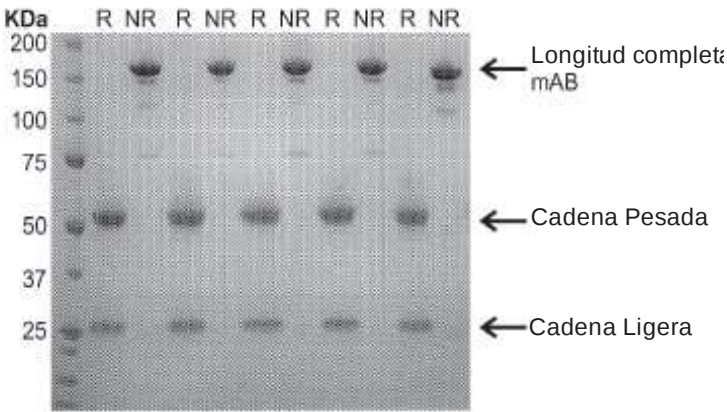


FIG. 8B

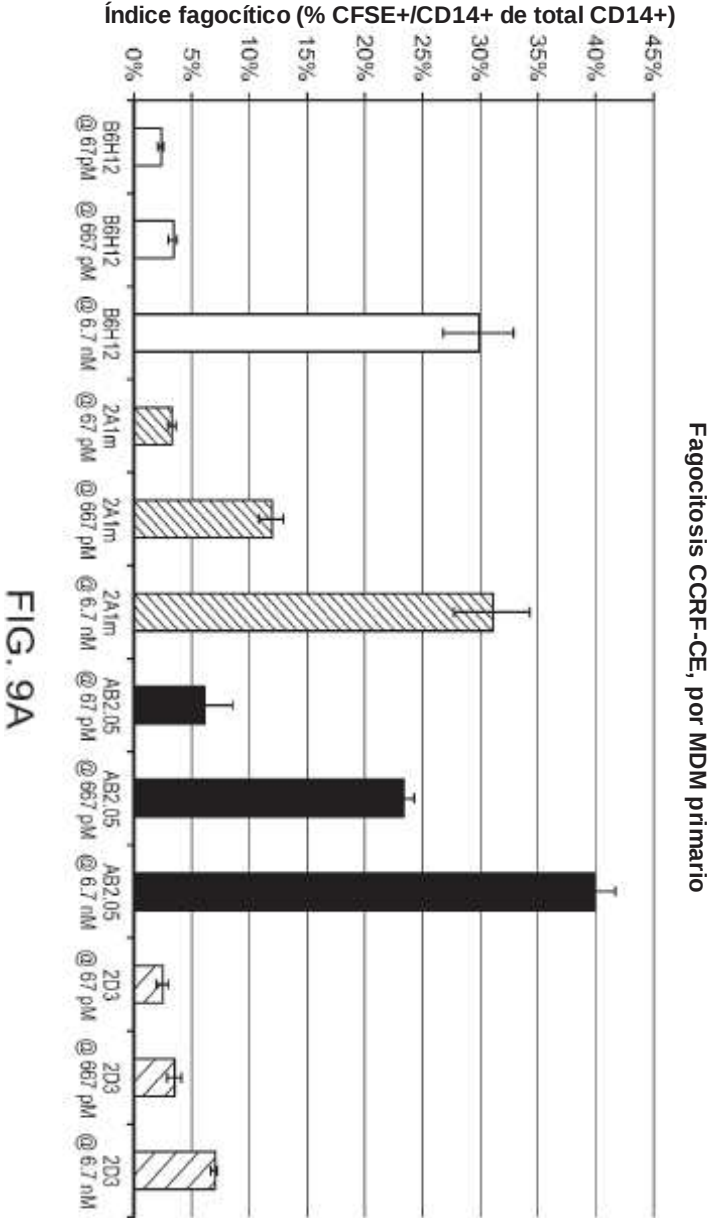
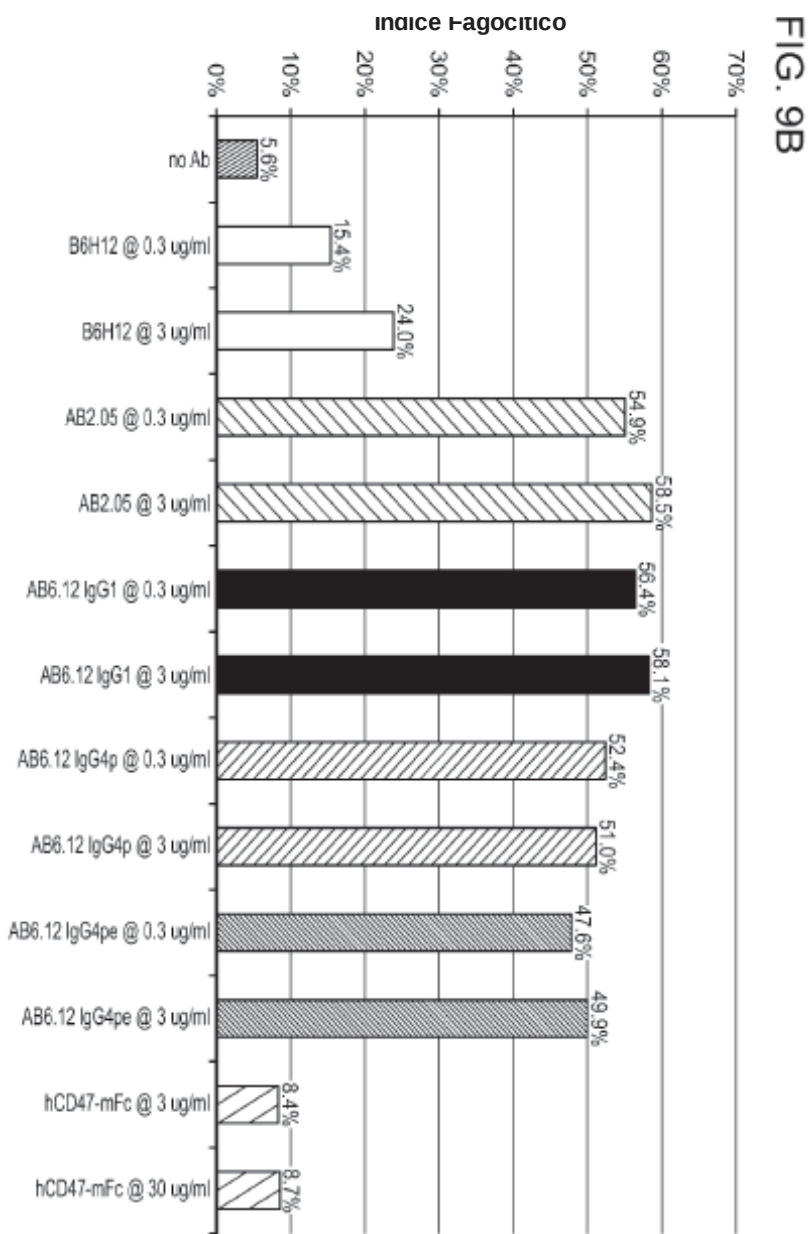
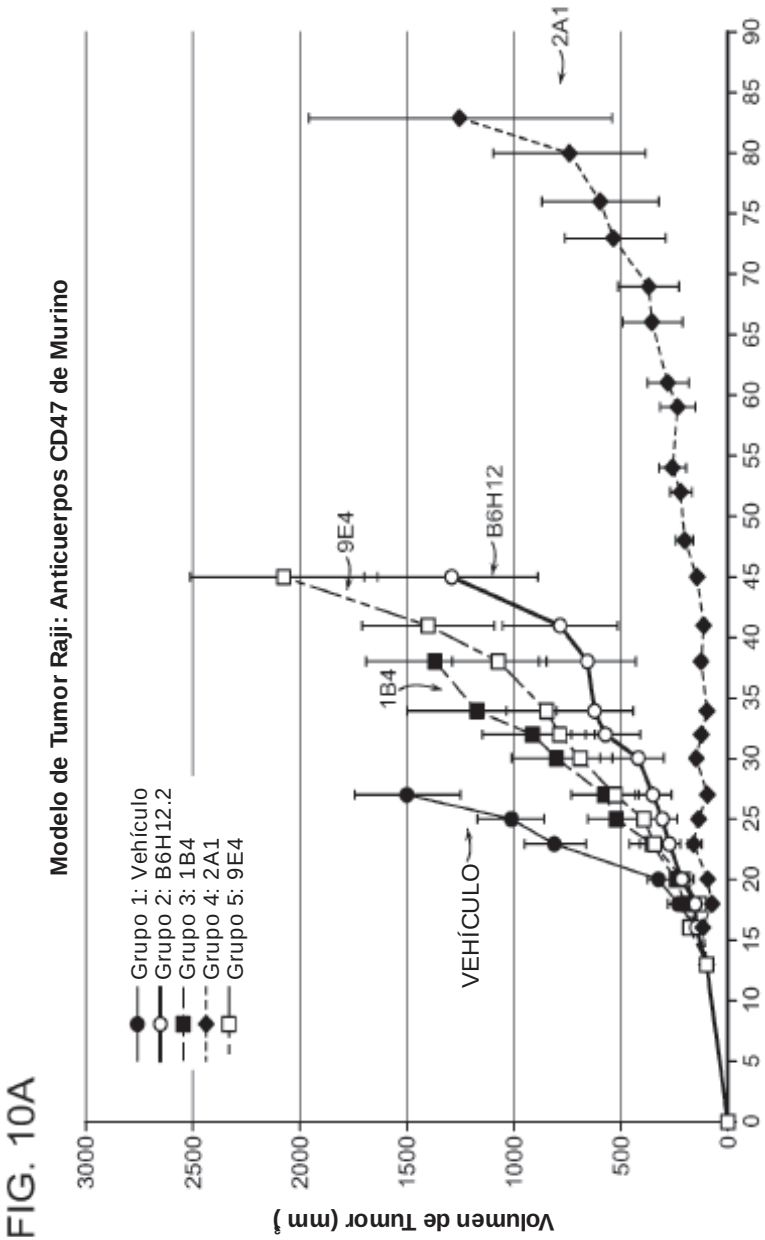
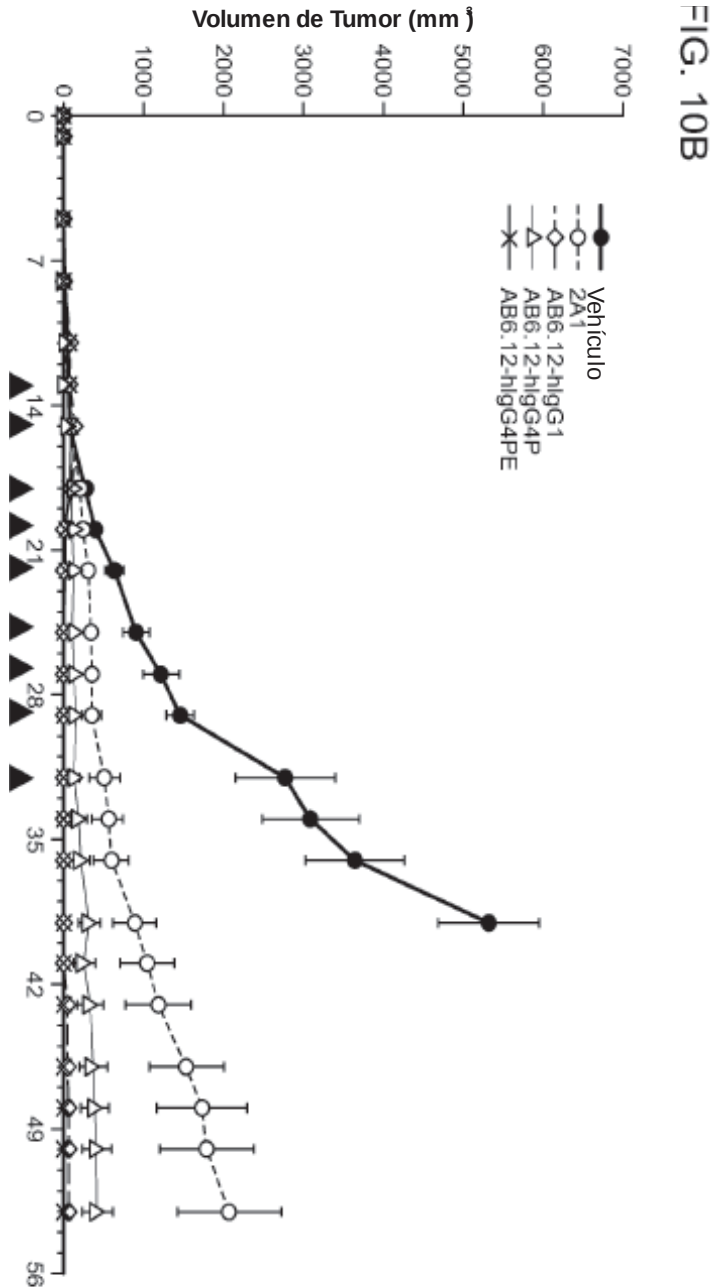


FIG. 9A







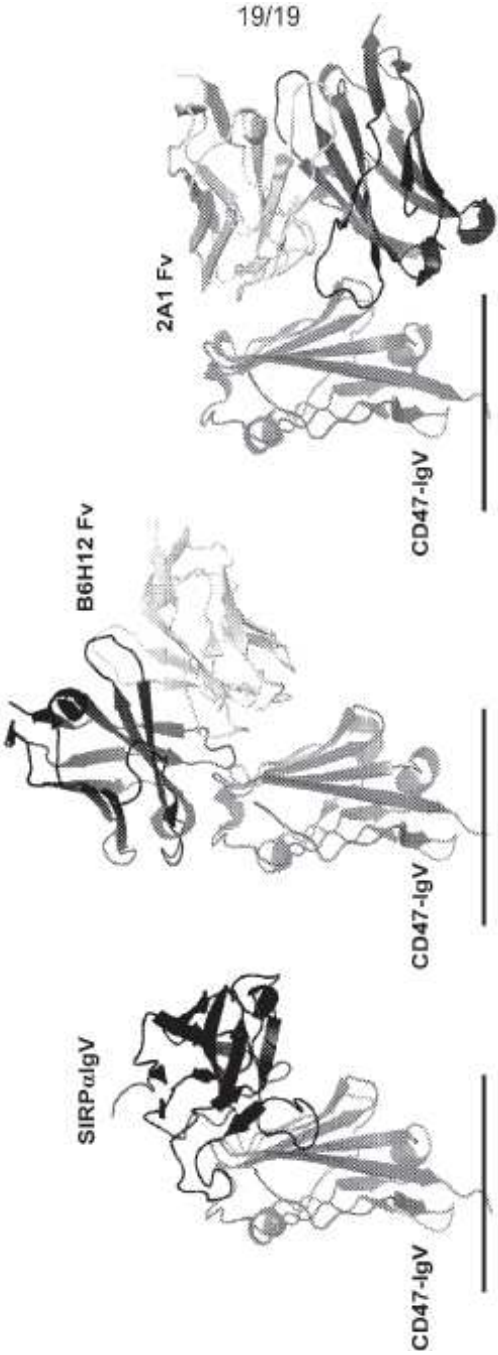


FIG. 11A

FIG. 11B

FIG. 11C

Secuencias P-4459
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> InhibRx LLC

<120> ANTICUERPOS CD47 Y MÉTODOS DE USO LOS MISMOS

<130> 42967-506001WO

<140> PCT/US2013/024995

<141> 2013-02-06

<150> US 61/595,216

<151> 2012-02-06

<150> US 61/659,752

<151> 2012-06-14

<160> 147

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1	5	Secuencias P-4459	10	15											
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40						45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50						55					60			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105						110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115				120						125			

Secuencias P-4459

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Secuencias P-4459

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 2

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

Secuencias P-4459

<400> 2

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1			5					10					15		

Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
		20						25					30		

Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			

Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50						55					60			

Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80

Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90				95	

Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
				100					105				110		

Secuencias P-4459

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

115

120

125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

130

135

140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145

150

155

160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165

170

175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180

185

190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195

200

205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu

210

215

220

Secuencias P-4459

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

Secuencias P-4459

<210> 3

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Secuencias P-4459

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Secuencias P-4459

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Secuencias P-4459

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 4

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Secuencias P-4459

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Secuencias P-4459

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Secuencias P-4459

Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
			260					265						270	

Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
		275					280					285			

Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
	290					295					300				

Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
305					310					315				320	

Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys
				325		

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 5

Secuencias P-4459

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Phe Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Secuencias P-4459

Gly Thr Ser Val Thr Val

115

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Glu Lys Phe

50

55

60

Secuencias P-4459

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 7

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
Página 17

Secuencias P-4459

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr			
	20	25	30
Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe			
	50	55	60
Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr			
	65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Thr Val Thr Val			
	115		

Secuencias P-4459

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 8

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Thr	Gly	Ser
1			5						10					15	

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		

Tyr	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40						45			

Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Asn	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55				60					

Secuencias P-4459

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 9

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Secuencias P-4459

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

Secuencias P-4459

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 10

Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Thr	Gly	Ser
1			5					10					15		

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr
		20					25						30		

Tyr	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40					45				

Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Asn	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55				60					

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Glu	Asp	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	

Secuencias P-4459

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 11

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

Secuencias P-4459

20

25

30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 12

<211> 118

Secuencias P-4459

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 12

Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Thr	Gly	Ser
1			5					10					15		

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr
		20					25						30		

Tyr	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			

Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Tyr	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50					55					60			

Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Arg	Ser	Met	Ser	Thr	Ala	Tyr
										75					80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr val Thr val
115

<210> 13

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 13

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Secuencias P-4459

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Ser Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
 115

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

Secuencias P-4459

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 14

Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Thr	Gly	Ser
1			5						10					15	

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr
		20					25						30		

Tyr	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40						45			

Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Asn	Ala	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				

Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Arg	Ser	Met	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	

Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Secuencias P-4459

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 15

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

Secuencias P-4459

35

40

45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Thr Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 16

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

Secuencias P-4459

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 16

Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Thr	Gly	Ser
1			5					10					15		

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr
		20					25						30		

Tyr	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40						45			

Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Asn	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				

Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Arg	Ser	Met	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	

Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Secuencias P-4459

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

Secuencias P-4459

<400> 18

Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Thr	Gly	Ser
1			5					10						15	

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Tyr	Tyr
		20					25						30		

Tyr	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40					45				

Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Asn	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				

Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Arg	Ser	Met	Ser	Thr	Ala	Tyr
65				70						75				80	

Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		

Asn	Ala	Ala	Tyr	Gly	Ser	Ser	Ser	Tyr	Pro	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
		100						105					110		

Secuencias P-4459

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 19

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Tyr Tyr

20

25

30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe

Secuencias P-4459

50

55

60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 20

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 20

Secuencias P-4459

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

<210> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 21

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Secuencias P-4459

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 22

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 22

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser

Secuencias P-4459															
1	5	10	15												
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
		20					25					30			
Tyr	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40					45				
Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Asn	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55				60					
Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Arg	Ser	Met	Ser	Thr	Ala	Tyr
65				70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Asn	Ala	Ala	Tyr	Gly	Ser	Ser	Ser	Tyr	Pro	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
		100						105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val										
		115													

Secuencias P-4459

<210> 23

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 23

Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Thr	Gly	Ser
1				5					10					15	

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20					25					30		

Tyr	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40						45		

Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Asn	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50					55					60			

Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Arg	Ser	Met	Ser	Thr	Ala	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

65 70 75 80

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

<210>	24
<211>	118
<212>	PRT
<213>	Secuencia Artificial

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 24

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Secuencias P-4459

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

Secuencias P-4459

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 25

Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Thr	Gly	Ser
1			5					10					15		

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	Asp	Tyr
		20					25					30			

Tyr	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40					45				

Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Asn	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55				60					

Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Arg	Ser	Met	Ser	Thr	Ala	Tyr
65				70						75				80	

Secuencias P-4459

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 26

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 26

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Asp Tyr

20

Página 46

Secuencias P-4459

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 27

Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Thr	Gly	Ser
1			5					10					15		

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr
		20					25					30			

Tyr	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Glu	Trp	Met
	35					40					45				

Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Asn	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				

Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Arg	Ser	Met	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	

Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Secuencias P-4459

85

90

95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
 115

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 28

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Secuencias P-4459

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

Secuencias P-4459

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Secuencias P-4459

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada variable de un anticuerpo CD47
humanizado

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

Secuencias P-4459
40

35

45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

Secuencias P-4459

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 31

Asp	Ile	Lys	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	

Glu	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	His	Arg	Tyr
			20					25					30		

Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Ile	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Tyr
65					70					75				80	

Glu	Asp	Met	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Glu	Phe	Pro	Tyr
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Met	Lys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Secuencias P-4459

100

105

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 32

Asp	Ile	Lys	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ser	Leu	Gly
1				5				10					15		

Glu	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	His	Arg	Tyr
			20					25					30		

Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Ile	Leu	Ile
			35				40						45		

Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55					60			

Secuencias P-4459

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Secuencias P-4459

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47

Secuencias P-4459

humanizado

<400> 34

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10						15	

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	His	Arg	Tyr
		20					25					30			

Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile
	35					40					45				

Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50				55					60					

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70					75					80	

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Glu	Phe	Pro	Tyr
				85				90					95		

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Secuencias P-4459
105

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 35

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Secuencias P-4459

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Secuencias P-4459

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile

35

40

45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

Secuencias P-4459

<400> 37

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	His	Arg	Tyr
		20					25					30			

Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35				40					45				

Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	

Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Glu	Phe	Pro	Tyr
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				100					105	

Secuencias P-4459

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 38

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1			5					10					15		

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	His	Arg	Tyr
			20					25					30		

Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35					40					45		

Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
			50					55					60		

Secuencias P-4459

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Gly Phe Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Secuencias P-4459

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

Secuencias P-4459

<400> 40

Asn	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Met	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Arg	Gln	Gly	Ile	His	Arg	Tyr
			20					25						30	

Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	His	Leu	Ile
			35				40						45		

Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55					60			

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Glu	Phe	Pro	Tyr
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				100					105	

Secuencias P-4459

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 41

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Ile Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

Secuencias P-4459

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 42

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Secuencias P-4459

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

Secuencias P-4459

<400> 43

Asn	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Met	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Arg	Gln	Gly	Ile	His	Arg	Tyr
			20					25					30		

Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Ile	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50				55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Glu	Phe	Pro	Tyr
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				100				105		

Secuencias P-4459

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 44

Asn	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Met	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Arg	Gln	Gly	Ile	His	Arg	Tyr
			20					25						30	

Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	His	Leu	Ile
			35				40						45		

Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55					60			

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

65 70 75 80 Secuencias P-4459

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 45

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Secuencias P-4459

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

Secuencias P-4459

<400> 46

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

Secuencias P-4459

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de cadena liviana variable de un anticuerpo CD47 humanizado

<400> 47

Asn	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Met	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Arg	Gln	Gly	Ile	His	Arg	Tyr
			20					25						30	

Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40						45		

Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55					60			

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65						70				75				80	

Secuencias P-4459

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 48

<211> 323

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
1 5 10 15

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
35 40 45

Secuencias P-4459

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
50 55 60

Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
65 70 75 80

Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
85 90 95

Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
100 105 110

Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
115 120 125

Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
130 135 140

Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
145 150 155 160

Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr

Secuencias P-4459

165

170

175

Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val

180

185

190

Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr

195

200

205

Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His

210

215

220

Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala

225

230

235

240

Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu

245

250

255

Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile

260

265

270

Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr

275

280

285

Secuencias P-4459

Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys
290 295 300

Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met
305 310 315 320

Asn Asp Glu

<210> 49

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn
1 5 10 15

Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn
20 25 30

Secuencias P-4459

Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr
35 40 45

Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu
65 70 75 80

Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys
85 90 95

Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
100 105 110

Tyr Arg Val Val
115

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

Secuencias P-4459

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VH

<400> 50

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR2 VH

<400> 51

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu

1 5 10

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

Secuencias P-4459

<223> secuencia de aminoacidos de CDR3 VH

<400> 52

Asn	Ala	Ala	Tyr	Gly	Ser	Ser	Ser	Tyr	Pro	Met	Asp	Tyr
1				5					10			

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VL

<400> 53

Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	His	Arg	Tyr	Leu	Ser
1				5					10	

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR2 VL

Secuencias P-4459

<400> 54

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR3 VL

<400> 55

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 56

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Lys Gly Arg Asp

Secuencias P-4459

1

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VH

<400> 57

Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VH

<400> 58

Gly Phe Thr Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His

1 5 10

Secuencias P-4459

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VH

<400> 59

Gly Tyr Asn Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VH

<400> 60

Gly Tyr Thr Ile Thr Tyr Tyr Tyr Leu His

1 5 10

Secuencias P-4459

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VH

<400> 61

Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VH

<400> 62

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

Secuencias P-4459

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VH

<400> 63

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VH

<400> 64

Gly Phe Thr Ile Thr Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 65

Secuencias P-4459

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VH

<400> 65

Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VH

<400> 66

Gly Phe Thr Phe Lys Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 67

<211> 11

Secuencias P-4459

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VL

<400> 67

Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VL

<400> 68

Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

Secuencias P-4459

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR2 VL

<400> 69

Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser

1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR2 VL

<400> 70

Arg Ala Asn Arg Arg Ala Thr

1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

Secuencias P-4459

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR2 VL

<400> 71

Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser

1

5

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VH

<400> 72

Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu

1

5

10

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

Secuencias P-4459

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VH

<400> 73

Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Tyr	Gly	Asp	Thr	Glu
1				5					10

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoacidos de CDR1 VH

<400> 74

Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Ser	Gly	Asp	Thr	Glu
1				5					10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

Secuencias P-4459

<223> secuencia de aminoácidos de CDR1 VH

<400> 75

Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Asn	Ala	Asp	Thr	Glu
1				5					10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de CDR1 VH

<400> 76

Trp	Ile	Asp	Pro	Asp	Asn	Thr	Asp	Thr	Glu
1				5					10

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de CDR3 VH

Secuencias P-4459

<400> 77

Asn	Ala	Ala	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	Tyr	Pro	Met	Asp	Tyr
1				5					10			

<210> 78

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región de cadena VH del anticuerpo 9E4

<400> 78

Glu	Val	Gln	Leu	Arg	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5				10						15	

Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20					25					30		

Tyr	Met	Tyr	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Arg	Val	Arg	Ser	Leu	Ala	Trp	Ile
			35				40					45			

Secuencias P-4459

Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Thr Gly Ala Thr Gly Tyr Asp Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ser Leu Ile Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Asn Arg Tyr Asp Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val
115

<210> 79

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región de cadena VL del anticuerpo 9E4

<400> 79

Secuencias P-4459

Glu Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Asp Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Ala Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

Secuencias P-4459

<210> 80

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región de cadena VH del anticuerpo 1B4

<400> 80

Gln	Ile	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5					10						15	

Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
		20					25						30		

Tyr	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40						45			

Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Arg	Phe
	50					55					60				

Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	

Secuencias P-4459

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Glu Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val
115

<210> 81

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> región de cadena VL del anticuerpo 1B4

<400> 81

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Secuencias P-4459

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 82

<211> 19

<212> ADN

Secuencias P-4459

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 82

cactgcaggt rtccactcc
19

<210> 83

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 83

catagcaggt gtccactcc
19

<210> 84

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

Secuencias P-4459

<400> 84

crctacaggt gtccactcc
19

<210> 85

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucléotido sintetizado químicamente

<400> 85

gcyacagmtg tccactcc
18

<210> 86

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucléotido sintetizado químicamente

<400> 86

cactgcaggt gtccwmtcc
19

Secuencias P-4459

<210> 87

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 87

crctrcaggt gtkcactcc
19

<210> 88

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 88

gctawmggtg tccactcc
18

<210> 89

<211> 17

Secuencias P-4459

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 89

cctcaggtgt ccactcc
17

<210> 90

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 90

gctacaggtg ctcactcc
18

<210> 91

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

Secuencias P-4459

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 91

cactgcaggt gtcctctct
19

<210> 92

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 92

caytgcaggt gtccaytgc
19

<210> 93

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 93

gctammggtg tccacttc
18

Secuencias P-4459

<210> 94

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 94

ctcctgtcak taactkcagg t
21

<210> 95

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 95

caactgcagg tgtctctct
19

<210> 96

<211> 19

Secuencias P-4459

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 96

crctrcaggy gtccactct
19

<210> 97

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 97

ccaagctgta tcctttcc
18

<210> 98

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

Secuencias P-4459

<223> cebador de oligonucléotido sintetizado químicamente

<400> 98

ccaagctgtg tcctracc
18

<210> 99

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucléotido sintetizado químicamente

<400> 99

cttgacagyc vttcckggt
19

<210> 100

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucléotido sintetizado químicamente

<400> 100

cttcacagcc tttcctggt

19

<210> 101

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 101

cttaaaaggg gtccagtgt
19

<210> 102

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 102

caytttaaaa rgtgtcmagt gt
22

<210> 103

Secuencias P-4459

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 103

gtttttaaag gtgtcctgtg
20

<210> 104

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 104

ctytttaaag gkgccagwg
20

<210> 105

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

Secuencias P-4459

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 105

cytttamatg gtatccagtg t
21

<210> 106

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 106

cttttacatg gtttcaagtg t
21

<210> 107

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 107

Secuencias P-4459

gtccctgcat atgtcyt
17

<210> 108

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 108

gatggcagcw gcycaaag
18

<210> 109

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 109

ctatcaaggt gtgcattgt
19

<210> 110

Secuencias P-4459

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 110

ctttttaaag wtgtccagkg t
21

<210> 111

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 111

gtgacagtcc ttcctggtag
20

<210> 112

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

Secuencias P-4459

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 112

cttcctgatg gcagtgggtt
19

<210> 113

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 113

gctacaggta tccaatcc
18

<210> 114

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 114

Secuencias P-4459

gcgtctagaa yctccacaca caggrccag tggatagac
39

<210> 115

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 115

ctgwtgttct ggattcctg
19

<210> 116

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 116

ggtcagacag tcagcagt
18

Secuencias P-4459

<210> 117

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 117

gtgctctgga ttcgggaa
18

<210> 118

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 118

cagcttcytg ctaatcagtg
20

<210> 119

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

Secuencias P-4459

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 119

ctaattcagtg cttcagga
18

<210> 120

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 120

gtgggtatct ggtrcstgtg
20

<210> 121

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

Secuencias P-4459

<400> 121

ggaaatttaa aagtacctgt ggg
23

<210> 122

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 122

ggtttcmagg trccagatgt
20

<210> 123

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 123

ctctgggttyc caggtatc
18

Secuencias P-4459

<210> 124

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 124

ctgttttcaa ggtrccagat gt
22

<210> 125

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 125

gttgtaatgt ccagagga
18

<210> 126

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

Secuencias P-4459

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 126

cttacagggtg ccagatgt
18

<210> 127

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 127

ctcaattgta grtgccagat gt
22

<210> 128

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

Secuencias P-4459

<400> 128

cacagtaggt gtcagatgt
19

<210> 129

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 129

gtcgtagttg tcagatgt
18

<210> 130

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 130

cctccttctt ggccaaga
18

Secuencias P-4459

<210> 131

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 131

cttatatgga gctgatggg
19

<210> 132

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 132

gtgtctgggtg ctcgatggg
18

<210> 133

<211> 20

<212> ADN

Secuencias P-4459
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucléotido sintetizado químicamente

<400> 133

ctstggttgt ctggtgttga
20

<210> 134

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucléotido sintetizado químicamente

<400> 134

gtctctgatt ctagggca
18

<210> 135

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucléotido sintetizado químicamente

Secuencias P-4459

<400> 135

ctkckctggg ttccag
16

<210> 136

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 136

gcaggtggtg acgga
15

<210> 137

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 137

caggtgcctc gtgcac
16

Secuencias P-4459

<210> 138

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 138

ctctggtgcc tgtgca
16

<210> 139

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 139

ctggaytyca gcctccaga
19

<210> 140

<211> 19

<212> ADN

Secuencias P-4459

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 140

gwtctctr ga gtcagtggg
19

<210> 141

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 141

ctggatccct ggakcyact
19

<210> 142

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

Secuencias P-4459

<400> 142

gttctgcttt ttaggtgtg
19

<210> 143

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 143

gatcccaggc atgatatgt
19

<210> 144

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 144

cttcatgggtg ctcagtgt
18

Secuencias P-4459

<210> 145

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 145

ccatatcagg tgcccagtg
20

<210> 146

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 146

gcgtctagaa ctggatggtg ggaagatgg
29

<210> 147

<211> 305

Secuencias P-4459

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Gln	Leu	Leu	Phe	Asn	Lys	Thr	Lys	Ser	Val	Glu	Phe	Thr	Phe	Cys	Asn
1				5					10					15	

Asp	Thr	Val	Val	Ile	Pro	Cys	Phe	Val	Thr	Asn	Met	Glu	Ala	Gln	Asn
			20						25					30	

Thr	Thr	Glu	Val	Tyr	Val	Lys	Trp	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Asp	Ile	Tyr
			35					40						45	

Thr	Phe	Asp	Gly	Ala	Leu	Asn	Lys	Ser	Thr	Val	Pro	Thr	Asp	Phe	Ser
							55					60			

Ser	Ala	Lys	Ile	Glu	Val	Ser	Gln	Leu	Leu	Lys	Gly	Asp	Ala	Ser	Leu
65						70				75				80	

Lys	Met	Asp	Lys	Ser	Asp	Ala	Val	Ser	His	Thr	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys
						85				90				95	

Secuencias P-4459

Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
100 105 110

Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu Ile Val
115 120 125

Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe Gly Ile
130 135 140

Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr Ile Ala
145 150 155 160

Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val Gly Ala
165 170 175

Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr Gly Leu
180 185 190

Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His Tyr Tyr
195 200 205

Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala Ile Leu

210	Secuencias P-4459										220
	215										
Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu Ser Leu											
225	230					235			240		
Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile Ser Gly											
245					250			255			
Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr Met Lys											
260				265				270			
Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys Ala Val											
275			280				285				
Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met Asn Asp											
290			295				300				
Glu											
305											

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number

WO 2013/119714 A1

(43) International Publication Date
15 August 2013 (15.08.2013)

(51) International Patent Classification:
C12P 21/08 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2013/024995

(22) International Filing Date:
6 February 2013 (06.02.2013)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/595,216 6 February 2012 (06.02.2012) US
61/659,752 14 June 2012 (14.06.2012) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
US 61/659,752 (CIP)
Filed on 14 June 2012 (14.06.2012)
US 61/595,216 (CIP)
Filed on 6 February 2012 (06.02.2012)

(71) Applicant: INHIBRX LLC [US/US]; 11099 N. Torrey Pines Road, Suite 130, La Jolla, CA 92037 (US).

(72) Inventors: ECKELMAN, Brendan; 11099 N. Torrey Pines Road, Suite 130, La Jolla, CA 92037 (US). TIMMER, John; 11099 N. Torrey Pines Road, Suite 130, La Jolla, CA 92037 (US). RAZAI, Amir; 11099 N. Torrey Pines Road, Suite 130, La Jolla, CA 92037 (US). DEVERAUX, Quinn; 11099 N. Torrey Pines Road, Suite 130, La Jolla, CA 92037 (US). JONES, Kyle; 11099 N. Torrey Pines Road, Suite 130, La Jolla, CA 92037 (US). NGUY, Peter, L.; 11099 N. Torrey Pines Road, Suite 130, La Jolla, CA 92037 (US).

(74) Agents: ELRIFI, Ivor, R. et al.; Mintz Levin Cohn Ferris Glovsky, And Popeo, P.c., One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))



WO 2013/119714 A1

(54) Title: CD47 ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREOF

(57) Abstract: This invention relates generally to monoclonal antibodies that recognize CD47, more specifically to CD47 antibodies that do not cause a significant level of agglutination of cells, to methods of generating these antibodies, and to methods of using these monoclonal antibodies as therapeutics.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0083531

Bogotá D.C., Agosto 05 de 2014 - 11:16:39

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 83.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	83520	05/08/2014		9.938.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
			\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

. Agosto 5 de 2014 - 11:16:42