

NUEVOS ANTICUERPOS ANTI-SIRPa Y SUS APLICACIONES

TERAPÉUTICAS

5

CAMPO TÉCNICO

La invención pertenece al campo de la inmunoterapia. La presente invención proporciona nuevos anticuerpos anti-SIRPa capaces de disminuir específicamente la interacción entre SIRPa y CD47 sin afectar la interacción entre SIRPg y CD47.

ANTECEDENTES

15

Los puntos de control inmunológicos dirigidos de la inmunidad adaptativa han demostrado una gran eficacia terapéutica para combatir numerosos tipos de cáncer, pero en una proporción limitada de pacientes. El punto de control inmunológico de las células mieloides (macrófagos, células dendríticas, MDSC, PMN) sigue siendo poco estudiado, mientras que estas células representan el tipo de célula inmunológica más abundante en muchos tumores sólidos y, a menudo, se asocian con un desenlace deficiente.

30

La proteína reguladora de señal alfa o SIRPa (también denominada SIRP α , CD172a o SHPS-1), se expresa en monocitos, la mayoría de las subpoblaciones de macrófagos tisulares, granulocitos, subconjuntos de células dendríticas en tejidos linfoides, algunas células progenitoras de la médula ósea y en varios niveles en las neuronas, con una expresión notablemente alta en áreas del cerebro ricas en sinapsis, como la capa granular del cerebelo y el hipocampo. SIRPa es el miembro prototípico de la familia de receptores emparejados de SIRP de

proteínas SIRP estrechamente relacionadas. El gen que codifica la SIRPa humana es un gen polimórfico y se describieron varias variantes en la población humana. Las variantes de proteínas más comunes son SIRPa v1 y v2 (números de acceso NP_542970 (P78324) y CAA71403). Los polimorfismos en la SIRP humana conducen a cambios en los aminoácidos expuestos en la superficie, pero esto no afecta la unión a CD47.

La interacción de SIRPa, expresada por células mieloides, con el receptor ubicuo CD47 es un importante punto de control inmunológico de la respuesta innata, involucrado en la regulación de las funciones mieloides. La interacción SIRPa con CD47 se describe en gran medida y proporciona una señal reguladora descendente que inhibe la fagocitosis de la célula huésped. CD47 se expresa ampliamente en niveles más bajos por la mayoría de las células sanas, pero también se sobreexpresa en algunas células cancerosas. Por lo tanto, el CD47 funciona como una señal de "no me comas". Tanto CD47 como SIRPa también participan en muchas otras interacciones. Una de las funciones fisiológicas mejor caracterizadas de la interacción CD47-SIRPa es su papel en la homeostasis de las células hematopoyéticas, en particular los glóbulos rojos y las plaquetas. Debido a que el CD47 sirve como una señal de "no me comas" y, como tal, es un determinante importante de la fagocitosis de las células huésped por los macrófagos, la contribución potencial de la interacción CD47-SIRPa en el aclaramiento de las células cancerosas ha sido investigada intensamente en los últimos años. Se demostró que la abundancia de receptores CD47 en tumores está correlacionada inversamente con la supervivencia global del paciente y constituye un factor pronóstico adverso para varios tipos de cáncer.

La vía SIRPa/CD47 está actualmente sujeta a diferentes desarrollos farmacéuticos para mejorar la fagocitosis de macrófagos. De hecho, al igual que las células infectadas, las células cancerosas transportan una carga anómala, como proteínas desconocidas o proteínas normales a niveles anormales; sin embargo, estas células con frecuencia subvierten los mecanismos de control inmunológico innatos mediante la sobreexpresión simultánea de moléculas inmunorreguladoras. Se está volviendo claro que uno de esos mecanismos involucra a CD47, una proteína "auto" expresada por las células normales. CD47 interactúa con SIRPa y conduce a la transmisión de una señal de "no me comas" a los macrófagos fagocíticos, que dejan las células objetivo sin afectar. La sobreexpresión de CD47 por las células cancerosas las hace resistentes a los macrófagos, incluso cuando las células cancerosas están recubiertas con anticuerpos terapéuticos, y se correlaciona con resultados clínicos pobres en numerosos cánceres sólidos y hematológicos. En modelos experimentales, en particular modelos de xenoinjerto de tumores humanos en ratones inmunodeficientes, el bloqueo de la vía CD47/SIRPa a través de agentes dirigidos a CD47 fue muy eficaz para promover la eliminación de tumores por macrófagos y para disminuir la diseminación de células cancerosas y la formación de metástasis. Se ha descrito que el bloqueo de la vía CD47/SIRPa a través de agentes dirigidos a CD47, al potenciar la fagocitosis dependiente de anticuerpos por macrófagos, hace sinergia con anticuerpos terapéuticos anticancerosos agotadores como el Trastuzumab (anti-Her2), Cetuximab (anti-EGFR), Rituximab (anti-CD20) y Alemtuzumab (anti-CD52).

Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los agentes dirigidos a CD47 (anti-CD47 o SIRPa-Fc) presentan toxicidad hematológica (anemia o trombocitopenia) relacionada

con el papel fisiológico de CD47.

Además, CD47 también se relaciona con otro miembro de la familia SIRP, SIRP-gamma (también designado como SIRPg, SIRPy, CD172g o SIRP beta 2) que está presente en la superficie de las células T humanas y no en las células mieloides humanas. SIRPg es el resultado de una duplicación del gen SIRPb en primates del viejo mundo hace casi 35 millones de años y se expresa de forma restringida en los linfocitos T en oposición a la expresión de SIRPa en células mieloides. SIRPg está ausente en ratones. Se ha demostrado que la interacción SIRPg-CD47 modula la adhesión célula-célula, mejora la proliferación mediada por células T dependientes de superantígenos y coestimula la activación de células T (Piccio *et al.*, Blood, 105:6, 2005).

Debido a la alta similitud de secuencias entre SIRPa y SIRPg, en particular en la región que interactúa con CD47, los anticuerpos anti-SIRPa descritos en la técnica anterior también se unen a SIRPg y tienen efectos indeseables en seres humanos, tales como una inhibición de la proliferación de células T y la disminución de la respuesta inmune. Dichos efectos secundarios de los anticuerpos anti-CD47 o no selectivos anti-SIRPa no pudieron predecirse ya que las pruebas de los anticuerpos conocidos se realizaron en modelos de ratones, que no poseen el gen SIRPg, y por lo tanto tales efectos secundarios estaban ausentes.

Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad significativa en la técnica de agentes nuevos y mejorados, en particular anticuerpos, para inmunoterapia segura, en particular contra el cáncer, que se dirija a células inmunes innatas sin impacto

perjudicial sobre las respuestas inmunes de células T. En particular, existe la necesidad de inhibir la interacción SIRPa-CD47 sin afectar la interacción SIRPg-CD47. Los presentes inventores han dado un paso significativo hacia adelante con la invención descrita en la presente memoria.

El propósito de la invención es satisfacer tal necesidad al proporcionar nuevos agentes, en particular anticuerpos, que permitan resolver total o parcialmente los problemas mencionados anteriormente.

En la presente memoria, los inventores proporcionan nuevos anticuerpos anti-SIRPa, en particular anticuerpos humanizados, que antagonizan la interacción SIRPa-CD47 pero no se unen específicamente a SIRPg y, por lo tanto, no afectan la interacción SIRPg-CD47.

Los anticuerpos de la invención tienen en particular las siguientes ventajas:

- Evitan la toxicidad hematológica debido a la expresión restringida de SIRPa (que no se une a glóbulos rojos y plaquetas humanos);

- Reducen el crecimiento tumoral y modifican el microambiente tumoral en monoterapia;

- Presentan efecto sinérgico con inhibidores de punto de control y agentes coestimuladores;

- Inducen respuestas antitumorales duraderas y robustas de linfocitos T de memoria;

- Permiten respuestas inmunes de células T humanas, siendo antagonistas selectivos de la interacción SIRPa-CD47, sin alterar la interacción CD47/SIRPg. Inesperadamente, los

inventores proporcionan dichos anticuerpos selectivos a pesar de la alta identidad de secuencia entre las secuencias SIRPa y SIRPg.

5 Estos nuevos anticuerpos seleccionados sobre la base de estas características son particularmente prometedores para numerosas aplicaciones terapéuticas, en particular para el tratamiento del cáncer, incluidos los cánceres inflamatorios y
10 los cánceres con células mieloides infiltradas (en particular con MDSCs infiltradas y/o células TAM).

ANTICUERPOS SIRPa (CON EPITOPES)

15 En un aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se une
20 específicamente al menos a un péptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2
25 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSRPDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) y SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE) dentro de SIRPa.

30 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica relevante.

 Por conveniencia, se proporciona el significado de ciertos términos y frases empleados en la especificación, ejemplos y reivindicaciones.

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" comprende anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales o anticuerpos recombinantes.

5 Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo monoclonal" pretende referirse a una preparación de moléculas de anticuerpo, anticuerpos que comparten una secuencia de aminoácidos de cadena ligera común y cadena ligera común, en
10 contraste con preparaciones de anticuerpos "policlonales" que contienen una mezcla de anticuerpos de diferente secuencia de aminoácidos. Los anticuerpos monoclonales pueden generarse mediante varias tecnologías conocidas como fagos, bacterias,
15 levaduras o presentación ribosomal, así como por procedimientos clásicos ejemplificados por anticuerpos derivados de hibridomas. Por lo tanto, el término "monoclonal" se usa para referirse a todos los anticuerpos derivados de un clon de ácido
20 nucleico.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos recombinantes. Como se usa en la presente memoria,
25 el término "anticuerpo recombinante" se refiere a anticuerpos que se producen, expresan, generan o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos que se expresan usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula
30 huésped; anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos combinatorios recombinantes; anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico debido a genes de inmunoglobulina humana; o anticuerpos que se producen, expresan, generan o aíslan de cualquier otra manera en la que se ensamblan secuencias de genes de inmunoglobulina particulares (como las secuencias de genes de inmunoglobulina humana) con otras secuencias de ADN. Los anticuerpos

recombinantes incluyen, por ejemplo, anticuerpos quiméricos y humanizados.

Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que la secuencia del dominio variable derivado de la línea germinal de una especie de mamífero, como un ratón, se ha injertado en la secuencia del dominio constante derivado de la línea germinal de otra especie de mamífero, como un humano.

Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo en el que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como un ratón, se han injertado en secuencias estructurales humanas.

Como se usa en la presente memoria, un "fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo" significa una parte de un anticuerpo, es decir, una molécula que corresponde a una parte de la estructura del anticuerpo de la invención, que exhibe capacidad de unión a antígeno para SIRPa, posiblemente en su forma nativa dicho fragmento exhibe especialmente la misma o sustancialmente la misma especificidad de unión a antígeno para dicho antígeno en comparación con la especificidad de unión a antígeno del correspondiente anticuerpo de cuatro cadenas. Ventajosamente, los fragmentos de unión a antígeno tienen una afinidad de unión similar a la de los anticuerpos de cadena 4 correspondientes. Sin embargo, el fragmento de unión a antígeno que tiene una afinidad reducida de unión a antígeno con respecto a los anticuerpos de cadena 4 correspondientes también se incluye dentro de la invención. La capacidad de unión al antígeno se puede determinar midiendo la afinidad entre el

anticuerpo y el fragmento objetivo. Estos fragmentos de unión a antígeno también pueden designarse como "fragmentos funcionales" de anticuerpos.

5

Los fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno son fragmentos que comprenden sus dominios hipervariables designados CDR (regiones determinantes de la complementariedad) o parte de los mismos que abarcan el sitio de reconocimiento del antígeno, es decir, el dominio extracelular de SIRPa, definiendo así la especificidad de reconocimiento del antígeno.

10

15

Cada dominio variable de la cadena ligera y pesada (respectivamente VL y VH) de una inmunoglobulina de cuatro cadenas tiene tres CDR, designadas VL-CDR1 (o LCDR1), VL-CDR2 (o LCDR2), VL-CDR3 (o LCDR3) y VH CDR1 (o HCDR1), VH-CDR2 (o HCDR2), VH-CDR3 (o HCDR3), respectivamente.

20

25

El experto en la técnica puede determinar la ubicación de las diversas regiones/dominios de anticuerpos por referencia a las definiciones estándar a este respecto establecidas, incluido un sistema de numeración de referencia, una referencia al sistema de numeración de KABAT o por aplicación del algoritmo "collier de perles" de IMGT. A este respecto, para la definición de las secuencias de la invención, se observa que la delimitación de las regiones/dominios puede variar de un sistema de referencia a otro. Por consiguiente, las regiones/dominios como se definen en la presente invención abarcan secuencias que muestran variaciones en la longitud o localización de las secuencias en cuestión dentro de la secuencia de longitud completa de los dominios variables de los anticuerpos, de aproximadamente $\pm 10\%$.

30

De acuerdo con la estructura de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas, los fragmentos de unión al antígeno se pueden definir por comparación con las secuencias de anticuerpos en las bases de datos disponibles y en la técnica anterior, y especialmente por la comparación de la ubicación de los dominios funcionales en estas secuencias, observando que las posiciones de la estructura y los dominios constantes están bien definidos para varias clases de anticuerpos, especialmente para las IgG, en particular para las IgG de mamíferos. Dicha comparación también implica datos relacionados con estructuras tridimensionales de anticuerpos.

Con fines ilustrativos de realizaciones específicas de la invención, los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo que contienen los dominios variables que comprenden las CDR de dicho anticuerpo abarcan Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂. Los fragmentos Fv consisten en los dominios VL y VH de un anticuerpo asociado entre sí por interacciones hidrófobas; en los fragmentos dsFv, el heterodímero VH:VL está estabilizado por un enlace disulfuro; en los fragmentos scFv, los dominios VL y VH están conectados entre sí a través de un enlazador peptídico flexible, formando así una proteína de cadena única. Los fragmentos Fab son fragmentos monoméricos que pueden obtenerse mediante la digestión con papaína de un anticuerpo; comprenden la cadena L completa y un fragmento VH-CH1 de la cadena H, unidos por un enlace disulfuro. El fragmento F(ab')₂ puede producirse por digestión con pepsina de un anticuerpo por debajo del disulfuro de bisagra; comprende dos fragmentos Fab y, además, una parte de la región bisagra de la molécula de inmunoglobulina. Los fragmentos Fab' se pueden obtener a partir de fragmentos F(ab')₂ al cortar un enlace disulfuro en

la región bisagra. Los fragmentos $F(ab')_2$ son divalentes, es decir, comprenden dos sitios de unión a antígeno, como la molécula de inmunoglobulina nativa; por otro lado, los fragmentos F_v (un regulador de VHVL que constituye la parte variable de Fab), dsF_v , scF_v , Fab y Fab' son monovalentes, es decir, comprenden un único sitio de unión a antígeno. Estos fragmentos básicos de unión a antígeno de la invención pueden combinarse entre sí para obtener fragmentos de unión a antígeno multivalentes, tales como diacuerpos, tricuerpos o tetracuerpos. Estos fragmentos de unión a antígeno multivalentes también son parte de la presente invención.

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpos biespecíficos" se refiere a anticuerpos que reconocen dos antígenos diferentes en virtud de poseer al menos una región (por ejemplo, derivada de una región variable de un primer anticuerpo) que es específica para un primer antígeno, y al menos una segunda región (por ejemplo, derivada de una región variable de un segundo anticuerpo) que es específica para un segundo antígeno. Un anticuerpo biespecífico se une específicamente a dos antígenos objetivo y, por lo tanto, es un tipo de anticuerpo multiespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos, que reconocen dos o más antígenos diferentes, pueden producirse mediante procedimientos de ADN recombinante o incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos producidos químicamente por cualquier procedimiento conveniente. Los anticuerpos biespecíficos incluyen todos los anticuerpos o conjugados de anticuerpos, o formas poliméricas de anticuerpos que son capaces de reconocer dos antígenos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos incluyen los anticuerpos que se han reducido y reformado para conservar sus características bivalentes y los anticuerpos que se han acoplado químicamente

para que puedan tener varios sitios de reconocimiento de antígenos para cada antígeno, como BiME (anticuerpos potenciadores de macrófagos biespecíficos), BiTE (acoplador biespecífico de células T), DART (redireccionamiento de afinidad dual); DNL (acoplar y bloquear), DVD-Ig (inmunoglobulinas de dominio variable dual), HAS (albúmina sérica humana), kih (modificación en orificios).

Por consiguiente, los anticuerpos biespecíficos de la invención se dirigen contra SIRPa y un segundo antígeno.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se definió anteriormente, que es biespecífico.

Varias investigaciones para desarrollar anticuerpos terapéuticos llevaron a diseñar las regiones Fc para optimizar las propiedades de los anticuerpos, permitiendo la generación de moléculas que se adaptan mejor a la actividad farmacológica requerida de los mismos. La región Fc de un anticuerpo modula su vida media en suero y sus funciones efectoras, como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). Se ha demostrado que varias mutaciones ubicadas en la interfaz entre los dominios CH2 y CH3, como T250Q/M428L y M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F, aumentan la afinidad de unión a FcRn y la vida media de IgG1 *in vivo*. Sin embargo, no siempre existe una relación directa entre el aumento de la unión de FcRn y la vida media mejorada. Un enfoque para mejorar la eficacia de un anticuerpo terapéutico es aumentar su persistencia en el suero,

permitiendo así mayores niveles de circulación, una administración menos frecuente y dosis reducidas. El diseño de regiones Fc puede desearse para reducir o aumentar la función efectora del anticuerpo. Para los anticuerpos que atacan a las moléculas de la superficie celular, especialmente las de las células inmunes, se requieren las funciones efectoras de anulación. A la inversa, para los anticuerpos destinados al uso oncológico, el aumento de las funciones efectoras puede mejorar la actividad terapéutica. Los cuatro isotipos de IgG humana se unen a los receptores Fcγ activadores (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa), el receptor inhibitorio FcγRIIb y el primer componente del complemento (C1q) con afinidades diferentes, que producen funciones efectoras muy diferentes. La unión de IgG a los FcγRs o C1q depende de los residuos ubicados en la región bisagra y el dominio CH2. Dos regiones del dominio CH2 son críticas para FcγRs y la unión a C1q, y tienen secuencias únicas en IgG2 e IgG4.

Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo modificado" corresponde a una molécula que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo monoclonal o fragmento funcional del mismo está asociado con una molécula funcionalmente diferente. Un anticuerpo modificado de la invención puede ser una proteína quimérica de fusión o un conjugado que resulte de cualquier forma adecuada de unión, incluyendo la unión covalente, el injerto, la unión química con un grupo químico o biológico o con una molécula, como un polímero de PEG u otro grupo protector o molécula adecuada para la protección contra la escisión de proteasas *in vivo*, para mejorar la estabilidad y/o la vida media del anticuerpo o fragmento funcional. Con técnicas similares, especialmente mediante acoplamiento químico o

injerto, se puede preparar un anticuerpo modificado con una molécula biológicamente activa, siendo dicha molécula activa, por ejemplo, elegida entre toxinas, en particular la exotoxina A de *Pseudomonas*, la cadena A de la toxina ricina de la planta o la toxina saporina, especialmente un ingrediente terapéutico activo, un vector (que incluye especialmente un vector de proteína) adecuado para dirigir el anticuerpo o fragmento funcional a células o tejidos específicos del cuerpo humano, o puede estar asociado con una etiqueta o con un enlazador, especialmente cuando los fragmentos del anticuerpo se usan. La PEGilación del anticuerpo o fragmentos funcionales del mismo es una realización interesante particular ya que mejora las condiciones de administración de la sustancia activa al huésped, especialmente para una aplicación terapéutica. La PEGilación puede ser de sitio específico para evitar la interferencia con los sitios de reconocimiento de los anticuerpos o fragmentos funcionales, y puede realizarse con PEG de alto peso molecular. La PEGilación se puede lograr a través de residuos de cisteína libres presentes en la secuencia del anticuerpo o fragmento funcional o mediante la adición de residuos de cisteína libres en la secuencia amino del anticuerpo o fragmento funcional.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se definió anteriormente, que se modifica.

Las macromoléculas de la invención comprenden anticuerpos y fragmentos de los mismos, pero también comprenden proteínas artificiales, péptidos y cualquier compuesto químico con la capacidad de unirse a antígenos que imitan a los anticuerpos, también denominados en la presente memoria mimético de

anticuerpo de unión a antígeno. Tales proteínas comprenden afitinas y anticalinas. Las afitinas son proteínas artificiales con la capacidad de unirse selectivamente a los antígenos. Se derivan estructuralmente de la proteína de unión al ADN Sac7d, que se encuentra en *Sulfolobus acidocaldarius*, un microorganismo que pertenece al dominio arqueal. Al aleatorizar los aminoácidos en la superficie de unión de Sac7d, por ejemplo, al generar variantes correspondientes a sustituciones aleatorias de 11 residuos de la interfaz de unión de Sac7d, se puede generar una biblioteca de afitinas y al someter la biblioteca de proteínas resultante a rondas de presentación de ribosomas, la afinidad puede dirigirse hacia diversos objetivos, como péptidos, proteínas, virus y bacterias. Las afitinas son anticuerpos miméticos y se están desarrollando como herramientas en biotecnología. También se han usado como inhibidores específicos para varias enzimas (Kreienbrink et al., J. mol. Biol., 383:5, 2008). El experto en la técnica puede desarrollar fácilmente anticalinas con las propiedades de unión requeridas usando procedimientos conocidos en la técnica, en particular como se describe en la solicitud de patente WO2008068637 y en la publicación citada anteriormente, en particular la generación de bibliotecas de presentación de fagos y/o ribosomas y su selección usando un antígeno como se describe en la presente memoria. Las anticalinas son proteínas artificiales que pueden unirse a antígenos, ya sea a proteínas o a moléculas pequeñas. Son anticuerpos miméticos derivados de lipocalinas humanas que son una familia de proteínas de unión natural. Las anticalinas son aproximadamente ocho veces más pequeñas con un tamaño de aproximadamente 180 aminoácidos y una masa de aproximadamente 20 kDa (Skerra, Febs J., 275:11, 2008). Se han generado bibliotecas de presentación de fagos de anticalina que permiten la detección y selección, en particular

de anticalinas con propiedades de unión específicas. El experto en la técnica puede desarrollar fácilmente afitinas con las propiedades de unión requeridas usando procedimientos conocidos en la técnica, en particular como se describe en la patente EP 1270725 B1, patente US 8536307 B2, (Schlehuber y Skerra, Biophys. Chem., 96: 2-3, 2002) y la publicación citada anteriormente, en particular la generación de bibliotecas de presentación de fagos y/o visualización de ribosomas y su selección usando un antígeno como se describe en la presente memoria. Las anticalinas y las afitinas pueden producirse en varios sistemas de expresión que comprenden sistemas de expresina bacteriana. Por lo tanto, la invención proporciona afitinas, anticalinas y otros miméticos de anticuerpos similares con las características de los anticuerpos descritos en la presente memoria, en particular con respecto a la unión a SIRPa, la inhibición de la interacción entre SIRPa y CD47, la no unión a SIRPg, la no unión a las células T, la no inhibición de la proliferación de las células T, la no inhibición de la interacción entre SIRPg y CD47, todas ellas contempladas como macromoléculas de la invención.

Todas las realizaciones descritas en la presente memoria para anticuerpos o fragmentos de los mismos se transponen *mutatis mutandis* a las macromoléculas de la invención, en particular a miméticos de anticuerpos de unión a antígeno.

Como se usa en la presente memoria, el término "epítopo" significa la parte de un antígeno al que se une el anticuerpo. Los epítopos de los antígenos proteicos se pueden dividir en dos categorías, epítopo conformacional y epítope lineal. Un epítopo conformacional corresponde a secciones discontinuas de la secuencia de aminoácidos del antígeno. Un epítopo lineal

corresponde a una secuencia continua de aminoácidos del antígeno.

En la invención, los péptidos que están presentes dentro de SIRPa y que están unidos por los anticuerpos anti-SIRPa son constitutivos del epítipo específicamente reconocido por estos anticuerpos.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se une específicamente a al menos dos, tres, cuatro o cinco péptidos que comprenden o consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) y SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE) dentro de SIRPa.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se une específicamente al péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E) dentro de SIRPa y al menos a un péptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) y SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE) dentro de SIRPa.

En una realización, la invención se relaciona con un

anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se une específicamente a los péptidos que comprenden o que consisten en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) y SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE) dentro de SIRPa.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se une específicamente al menos a un péptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 7 (GRELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 8 (KFRKGSPDDVE), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) y SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE) dentro de SIRPa.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que se une específicamente a los péptidos de SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 7 (GRELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 8 (KFRKGSPDDVE), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) y SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE) dentro de SIRPa.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se une específicamente al menos a un péptido que comprende o que

consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 9 (ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 10 (KFRKGSPDTE), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) y SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE).

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que se une específicamente a los péptidos de SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 9 (ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 10 (KFRKGSPDTE), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) y SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE) dentro de SIRPa.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se une específicamente al menos a un péptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 11 (GRELIYN), DVE, SEQ ID NO: 12 (HTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) y SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE) dentro de SIRPa.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que se une específicamente a los péptidos de SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 11 (GRELIYN), DVE, SEQ ID NO: 12 (HTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) y SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE) dentro de SIRPa.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se une específicamente al menos a un péptido que comprende o que
5 consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 13 (ARELIYN), SEQ ID NO: 12 (HTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) y SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE) dentro de SIRPa.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se
15 definió anteriormente que se une específicamente a los péptidos de SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 13 (ARELIYN), SEQ ID NO: 12 (HTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) y SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE) dentro de SIRPa.

Los péptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:
25 12 y SEQ ID NO: 13 corresponden a epítomos lineales.

Estos epítomos lineales han sido identificados por los inventores mediante el escaneo de oligopéptidos basados en
30 matriz (a veces llamado escaneo de péptidos superpuestos o análisis pepscan). Esta técnica usa una biblioteca de secuencias oligo-peptídicas de segmentos superpuestos y no superpuestos de una proteína objetivo y prueba su capacidad para unirse al anticuerpo de interés. Combinando secuencias peptídicas no adyacentes de diferentes partes de la proteína objetivo y aplicando rigidez conformacional en este péptido combinado (como por ejemplo usando andamiajes CLIPS) (Timmerman

et al., 2007, J Mol Recognit., Sep-Oct;20(5):283-99), los epítomos discontinuos se pueden mapear con una confiabilidad y precisión muy altas (Gaseitsiwe et al., 2010 - Clin Vaccine Immunol. Ene; 17(1): 168-175). Todos los anticuerpos ensayados de la invención, incluyendo HEFLB, se unen específicamente a dichos epítomos.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que se une específicamente a un epítome conformacional que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR), SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN) y SEQ ID NO: 72 (SPRDITLKW) dentro de SIRPa.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que se une específicamente a un epítome conformacional que comprende o consiste en los péptidos de SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR), SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN) y SEQ ID NO: 72 (SPRDITLKW) dentro de SIRPa.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que se une específicamente a un epítome conformacional que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR) y SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN).

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que se une específicamente a un epítope conformacional que comprende o consiste en los péptidos de SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR) y SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN) dentro de SIRPa.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que se une específicamente a un epítope conformacional que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 73 (YNQK) y "SIR" dentro de SIRPa.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que se une específicamente a un epítope conformacional que comprende o consiste en el péptido de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 73 (YNQK) y el péptido de la secuencia de aminoácidos SIR dentro de SIRPa.

Los péptidos de SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73 y SIRP corresponden a epítomos conformacionales. Estos epítomos conformacionales han sido determinados por los inventores usando procedimientos de protección de proteólisis (digestión enzimática: quimotripsina, tripsina del complejo antígeno-anticuerpo inmovilizado en cromatografía de afinidad) seguidos por análisis de espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF) para

detectar y secuenciar tales péptidos de interés, bien conocido por un experto en la técnica (Van de Water *et al.*, Inmunología Clínica e Inmunopatología, 1997, vol. 85). El antígeno usado fue el SIRPa humana (números de acceso NP_542970) y uno de los anticuerpos de la invención usado fue la variante HEFLB.

El anticuerpo anti-SIRPa o el fragmento de unión a antígeno del mismo o el mimético de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con la invención se unen específicamente a dichos epítomos conformacionales que comprenden o consisten en dichos péptidos en su disposición conformacional dentro de la SIRPa nativa.

El péptido de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 73 (YNQK) corresponde al péptido que consiste en aminoácidos en la posición 80 a 83 en la secuencia de aminoácidos SIRPa humana referenciada por el número de acceso NP_542970.

El péptido de la secuencia de aminoácidos SIR, el péptido SIR, corresponde al péptido que consiste en aminoácidos en la posición 105 a 107 en la secuencia de aminoácidos SIRPa humana referenciada por el número de acceso NP_542970.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "SIRPa" se refiere a una proteína SIRPa de una especie de mamífero, preferentemente una SIRPa humana (por ejemplo, números de acceso NP_542970 (P78324) y CAA71403).

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo anti-SIRPa" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a SIRPa, en particular a una SIRPa humana.

La unión específica entre el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención y el epítopo (o la región que comprende el epítopo) implica que el anticuerpo muestra una afinidad apreciable por el epítopo (la región que comprende el epítopo) en una proteína o antígeno particular (en este caso SIRPa). La "afinidad apreciable" incluye la unión con una afinidad de aproximadamente 10^{-9} M (KD) o más fuerte. Preferentemente, la unión se considera específica cuando la afinidad de unión está entre 10^{-9} M y 10^{-12} M, opcionalmente entre 10^{-9} M y 10^{-10} M, en particular 10^{-10} M. Si un dominio de unión reacciona específicamente con un objetivo o se une a un objetivo puede probarse fácilmente comparando, entre otras cosas, la reacción de dicho dominio de enlace con una proteína o antígeno objetivo con la reacción de dicho dominio de enlace con proteínas o antígenos distintos de la proteína objetivo.

La afinidad se puede determinar por varios procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, análisis de Biacore, análisis de Blitz y gráfico de Scatchard.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que tiene un valor KD menor que 10^{-9} M, preferentemente menor que 10^{-10} M para SIRPa, más preferentemente menor que $1,10^{-11}$ M, particularmente por análisis de Biacore.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del

mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que disminuye la interacción entre SIRPa y CD47.

5 En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que parcial o completamente, en
10 particular, inhibe la unión de CD47 a SIRPa, en particular de CD47 humana a la SIRPa humana.

15 Dicho anticuerpo de la invención se une específicamente a SIRPa y antagoniza la interacción entre SIRPa y CD47.

20 En particular, el anticuerpo antagonista anti-SIRPa de la invención es capaz de reducir o inhibir la unión de CD47 a SIRPa en al menos 50 %, 60 %, 70 %, preferentemente 80 %, más preferentemente 90 % o lo más preferentemente 100 %, en comparación con una molécula de control negativo, en un ensayo de unión.

25 En particular, el anticuerpo antagonista anti-SIRPa de la invención es capaz de reducir o inhibir la unión de CD47 a SIRPa de 50 % a 100 %, preferentemente de 60 % a 90 %, más
30 preferentemente de 70 % a 80 %, en comparación con una molécula de control negativo, en un ensayo de unión.

Los procedimientos para determinar la especificidad de los anticuerpos y la afinidad por inhibición competitiva son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Harlow *et al.*, Anticuerpos: un manual de laboratorio, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1998); Colligan *et*

al., Protocolos actuales de inmunología, Green Publishing Assoc., NY (1992; 1993); Muller, Meth. Enzym., 92: 589-601 (1983)) y se describen en los ejemplos a continuación.

5 Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, análisis de Biacore, análisis de Blitz, citometría de flujo y ensayo ELISA.

10 En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPa, como se define anteriormente, que tiene una IC50 menor que 500 ng/ml, en particular menor que 400 ng/ml, 300 ng/ml, más particularmente menor que 200 ng/ml según
15 lo determinado en un ensayo competitivo de unión de SIRPa entre CD47 y el anticuerpo anti-SIRPa por ELISA.

20 En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPa, como se define anteriormente, que tiene una IC50 menor que 500 ng/ml, en particular menor que 400 ng/ml, 300 ng/ml, más particularmente menor que 200 ng/ml menor que 150 ng/ml e incluso más particularmente menor que 100 ng/ml según lo determinado por el ensayo competitivo de citometría
25 en monocitos humanos entre CD47 y el anticuerpo anti-SIRPa.

30 En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que no se une específicamente a SIRPg, preferentemente a SIRPg humana.

 Dicho anticuerpo de la invención no afecta o no impide la interacción entre SIRPg y CD47.

 Como se usa en la presente memoria, el término "SIRPg" se

refiere a una proteína gamma reguladora de señal (también denominada SIRP gamma, CD172g o SIRP beta 2), de una especie de mamífero, preferentemente una SIRPg humana.

5

Una secuencia de referencia de la proteína SIRPg humana, usada en los ejemplos de la presente solicitud, corresponde a la secuencia asociada al número de acceso Q9P1W8.

10

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que tiene un valor KD superior a 10^{-9} M, preferentemente superior a 10^{-8} M, más preferentemente superior a 10^{-7} M para SIRPg, en particular por análisis de Blitz.

15

20

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que no inhibe, antagoniza significativamente, la unión de CD47 a SIRP-g, que no compite significativamente con la unión de CD47 a SIRPg.

25

30

Este efecto antagonista se puede determinar usando los procedimientos tal como se definen en los ejemplos de la presente solicitud.

En la invención, se puede considerar que un anticuerpo (o un fragmento de unión a antígeno o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno) no antagoniza la unión de CD47 a SIRPg si dicho anticuerpo (o el fragmento de unión a antígeno del mismo) o el mimético de anticuerpo de unión a antígeno) no induce aumento, o induce un aumento menor que 1 log, del valor KD de

CD47 en un ensayo competitivo de unión SIRPg por Blitz.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que no se une específicamente a células T, en particular a células T CD3+.

En particular, el anticuerpo anti-SIRPa o el fragmento de unión a antígeno del mismo o el mimético de anticuerpo de unión a antígeno de la invención no se unen a células T de especies de mamíferos, en particular a células T humanas.

En particular, se considera que un anticuerpo anti-SIRPa (o el fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno) no se une específicamente a las células T humanas si, en una población de células T humanas aisladas de PBMC de un donante sano, menos del 10 %, preferentemente menos del 5 %, más preferentemente menos del 2 %, más preferentemente menos del 1 % de la población de células T humanas son reconocidas por dicho anticuerpo anti-SIRPa (o fragmento de unión a antígeno del mismo o mimético de anticuerpo de unión a antígeno).

Este efecto puede medirse por los procedimientos descritos en los ejemplos de la presente solicitud.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que no inhibe significativamente la proliferación de células T, en particular células T CD3+,

preferentemente de especies de mamíferos y más preferentemente de células T humanas.

En particular, se considera que un anticuerpo anti-SIRPa no inhibe significativamente la proliferación de células T si la proliferación de células T se reduce en menos del 30 %, preferentemente menos del 20 %, más preferentemente menos del 10 %, lo más preferentemente menos del 5 % en comparación con un control negativo.

La proliferación de células T se puede determinar por varios procedimientos. Por ejemplo, la proliferación de células T puede medirse por incorporación de timidina H³ como se describe en los ejemplos de la presente solicitud.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que no inhibe, antagoniza significativamente, la unión de las proteínas tensioactivas a SIRP-a, que no compite significativamente con la unión de las proteínas tensioactivas a SIRPa.

Como se usa en la presente memoria, las "proteínas tensioactivas" son lectinas de tipo C (dependientes de calcio) que contienen colágeno, que contribuyen significativamente a la homeostasis del tensioactivo y la inmunidad pulmonar (para una revisión, ver Kishore *et al.*, Proteínas tensioactivas SP-A y SP-D): estructura, función y receptores, Mol Immunol, 43(9), 1293-315, 2006).

Como se usa en la presente memoria, el término "proteína

tensioactiva" se refiere a una proteína tensioactiva de una especie de mamífero, preferentemente una proteína tensioactiva humana.

5

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que no inhibe la unión de la proteína D

10

tensioactiva humana (SP-D) a SIRPa.

15

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que no inhibe la unión de la proteína A tensioactiva humana (SP-A) a SIRPa.

20

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que no antagoniza la interacción entre

25

las proteínas tensioactivas y SIRPa.

30

La competencia entre SIRPa y proteínas tensioactivas se puede determinar mediante un ensayo competitivo usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, entre otros, análisis de Biacore, análisis de Blitz y ensayo ELISA.

En la invención, se puede considerar que un anticuerpo (o el fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno) no antagoniza la unión de una proteína tensioactivo a SIRPa si dicho anticuerpo (o fragmento

de unión a antígeno del mismo o mimético de anticuerpo de unión a antígeno) no induce aumento, o induce un aumento menor que 1 log, del valor KD de la proteína tensioactivo en un ensayo competitivo de unión de SIRPa por Blitz.

5

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que se une débilmente, o no se une específicamente a SIRPb.

10

Como se usa en la presente memoria, el término "SIRPb" se refiere a una proteína SIRPb (también denominada SIRP β , proteína reguladora de la señal beta-1, SIRP-beta-1, miembro de la familia de tipo antígeno CD172 B o CD172b) de una especie de mamífero, preferentemente un SIRPb humano.

15

20

Una secuencia de referencia de la proteína SIRPb humana, usada en los ejemplos de la presente solicitud, corresponde a la secuencia asociada al número de acceso Q5TFQ8-1.

25

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que tiene un valor KD superior a 10^{-9} M, preferentemente superior a 10^{-8} M para SIRPb, en Particularmente por el análisis de Blitz.

30

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que comprende:

a) una cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3,
y/o

b) una cadena ligera que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3,
en el que dichas CDR se definen como sigue:

5 - HCDR1 comprende o consiste en la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

10 - HCDR2 comprende o consiste en la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15 (NIDPSDSDTHYNQKFKD) o
SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

15 - HCDR3 comprende o consiste en la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17 (GGTGTMAWFAY) SEQ ID NO:
18 (GGTGTLAWFAY), SEQ ID NO: 19 (GGTGTMAWFAY) o SEQ ID NO: 20
(GGTGTLAYFAY),

- LCDR1 comprende o consiste en la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

20 - LCDR2 comprende o consiste en la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), y

- LCDR3 comprende o consiste en la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

25 **18D5 / Variante A / Variante B**

30 En una realización, la invención se relaciona con un
anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del
mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se
definió anteriormente que comprende:

a) una cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3,
y/o

b) una cadena ligera que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3,
en el que dichas CDR se definen como sigue:

- HCDR1 comprende o consiste en la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

- HCDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15 (NIDPSDSDTHYNQKFKD),

- HCDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17 (GGTGTMAWFAY),

5 - LCDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

- LCDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), y

10 - LCDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

Variante C

15

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente que comprende:

20

a) una cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y/o

25

b) una cadena ligera que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que dichas CDR se definen como sigue:

- HCDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

30

- HCDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

- HCDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17 (GGTGTMAWFAY),

- LCDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

- LCDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), y

- LCDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

Variante E

5

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que comprende:

10

a) una cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y/o

15

b) una cadena ligera que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que dichas CDR se definen como sigue:

- HCDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

20

- HCDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

- HCDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 18 (GGTGTLAWFAY),

25

- LCDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

- LCDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), y

30

- LCDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

Variante F

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se

define anteriormente, que comprende:

a) una cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3,
y/o

5 b) una cadena ligera que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3,
en el que dichas CDR se definen como sigue:

- HCDR1 comprende o consiste en la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

10 - HCDR2 comprende o consiste en la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

- HCDR3 comprende o consiste en la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 19 (GGTGT MAYFAY),

15 - LCDR1 comprende o consiste en la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

- LCDR2 comprende o consiste en la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), y

20 - LCDR3 comprende o consiste en la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

Variante EF

25

En una realización, la invención se refiere a un
anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del
mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se
30 define anteriormente, que comprende:

a) una cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3,
y/o

b) una cadena ligera que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3,
en el que dichas CDR se definen como sigue:

- HCDR1 comprende o consiste en la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

- HCDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

- HCDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20 (GGTGTLAYFAY),

5

- LCDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNLY),

- LCDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), y

10

- LCDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

15

Los anticuerpos anti-SIRPa de la invención pueden tener una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de HCDR1 y/o HCDR2 y/o HCDR3 de los anticuerpos humanos tal como se proporciona en la presente memoria; y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de LCDR1 y/o LCDR2 y/o LCDR3 de los anticuerpos humanos tal como se proporciona en la presente memoria.

20

25

En una realización, el anticuerpo comprende una variante de secuencia de aminoácidos de una o más de las CDR de los anticuerpos humanos proporcionados, cuya variante comprende una o más inserciones de aminoácidos dentro o adyacentes a un residuo de CDR y/o delección(es) dentro o adyacentes a un residuo de CDR y/o sustitución(es) de (el/los) residuo(s) de CDR (siendo la(s) sustitución(es) del tipo de aminoácido preferente para generar tales variantes).

30

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que comprende:

- un dominio variable de cadena pesada comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30, y/o

- un dominio variable de cadena ligera comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33.

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que comprende:

- un dominio variable de cadena pesada comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30, y

- un dominio variable de cadena ligera comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33.

Las secuencias de los dominios variables específicos se proporcionan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Ejemplos de dominios variables de cadena pesada y dominios variables de cadena ligera de anticuerpos de acuerdo con la invención.

Dominio variable de cadena pesada del anticuerpo de tipo salvaje (quimérico y ratón 18D5)	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYWVHWVKQR PIQGLEWIGNIDPSDSDTHYNQKFKDKASLTVDKSSSTAY MQLSSLTFEDSAVYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGLTVTVSA	SEQ ID NO: 24
---	--	------------------

5	Dominio variable de cadena pesada de variante humanizada (HA)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYTFTSYVHWVRQM PGKGLEWIGNIDPSDSDTHYNQKFKDHVTLSDVKSISTAY LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 25
		EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYVHWVRQM PGKGLEWMGNIDPSDSDTHYNQKFKDHVTLSDVKSISTAY LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 26
10	Dominio variable de cadena pesada de variante humanizada (HB)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYTFTSYVHWVRQM PGKGLEWIGNIDPSDSDTHYNQKFKDHVTLSDVKSISTAY LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 27
		EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYVHWVRQM PGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSISTAY LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 28
15	Dominio variable de cadena pesada de variante humanizada (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYTFTSYVHWVRQM PGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSISTAY LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 29
		EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYVHWVRQM PGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSISTAY LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 30
20	Dominio variable de cadena pesada de variante humanizada (HE)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYTFTSYVHWVRQM PGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSISTAY LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 31
		EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYVHWVRQM PGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSISTAY LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 32
25	Dominio variable de cadena pesada de variante humanizada (HF)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYTFTSYVHWVRQM PGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSISTAY LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 33
		EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYVHWVRQM PGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSISTAY LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 34
30	Cadena ligera del anticuerpo de tipo salvaje (quimérico y ratón 18D5)	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSYGNTYLYW YLQKPGQSPKLLIYRVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYFCFQGTHTVPTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO: 35
		DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSYGNTYLYW YLQKPGQSPKLLIYRVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYFCFQGTHTVPTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO: 36
	Dominio variable de cadena ligera de variante humanizada A (LA)	DVVMQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYW YQQRPGQSPRLLIYRVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYFCFQGTHTVPTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 37
		DVVMQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYW YQQRPGQSPRLLIYRVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYFCFQGTHTVPTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 38
	Dominio variable de cadena ligera de variante humanizada (LB)	DVVMQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYW FQQRPGQSPRLLIYRVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCFQGTHTVPTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 39
		DVVMQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYW FQQRPGQSPRLLIYRVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCFQGTHTVPTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 40

anticuerpos ejemplificados en la presente invención pueden deducirse de las combinaciones de las secuencias mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2. Dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena ligera de anticuerpos específicos de acuerdo con la invención.

Anticuerpo	Dominio variable de cadena pesada	Dominio variable de cadena ligera
18D5 (quimérico y ratón)	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 31
HALA	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 32
HALB	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 33
HBLA	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 32
HBLB	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 33
HCLA	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 32
HCLB	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 33
HELA	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 32
HELB	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 33
HFLA	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 32
HFLB	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 33
HEFLA	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 32
HEFLB	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 33

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que comprende un dominio variable de cadena ligera comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 33.

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del

mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que comprende:

- un dominio variable de cadena ligera comprende o
5 consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 33, y

- un dominio variable de cadena pesada comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo
que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26,
10 SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30,
preferentemente

- un dominio variable de cadena pesada comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo
15 que consiste en SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30,
más preferentemente

- un dominio variable de cadena pesada comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo
20 que consiste en SEQ ID NO: 30,

En una realización, la invención se refiere a un
anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del
mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se
25 define anteriormente, que comprende:

- un dominio variable de cadena pesada comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:
24, y
30

- un dominio variable de cadena ligera comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:
31,

o

- un dominio variable de cadena pesada que comprende o
consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID
NO: 25, y

- un dominio variable de cadena ligera comprende o

consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

32,

o

- un dominio variable de cadena pesada que comprende o

5 consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 25, y

- un dominio variable de cadena ligera comprende o

10 consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

33,

o

- un dominio variable de cadena pesada comprende o

15 consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

26, y

- un dominio variable de cadena ligera comprende o

consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

32,

20

o

- un dominio variable de cadena pesada comprende o

consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

26, y

25

- un dominio variable de cadena ligera comprende o

consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

33,

o

30

- un dominio variable de cadena pesada comprende o

consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

27, y

- un dominio variable de cadena ligera comprende o

consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

32,

o

- un dominio variable de cadena pesada comprende o

consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:
27, y

- un dominio variable de cadena ligera comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

5

33,

o

- un dominio variable de cadena pesada que comprende o
consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID

10

NO: 28, y

- un dominio variable de cadena ligera comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

32,

15

o

- un dominio variable de cadena pesada que comprende o
consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID

NO: 28, y

20

- un dominio variable de cadena ligera comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

33,

o

25

- un dominio variable de cadena pesada comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

29, y

- un dominio variable de cadena ligera comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

30

32,

o

- un dominio variable de cadena pesada comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

29, y

- un dominio variable de cadena ligera comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

33,

o

- un dominio variable de cadena pesada que comprende o
consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID
5 NO: 30, y

- un dominio variable de cadena ligera comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:
32,

10

o

- un dominio variable de cadena pesada que comprende o
consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID
NO: 30, y

15

- un dominio variable de cadena ligera que comprende o
consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID
NO: 33.

20

En una realización, el anticuerpo o el fragmento de unión
a antígeno o el mimético de anticuerpo de unión a antígeno no
tiene sustitución del aminoácido W en la posición 33 (W33) en
el dominio variable de cadena pesada, identificándose dicha
25 posición con respecto a SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID
NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 o SEQ ID
NO: 30, y/o no sustitución de los aminoácidos Y en la posición
39 (Y39), R en la posición 55 (R55) y/o F en la posición 60
30 (F60) en el dominio variable de la cadena ligera, dichas
posiciones se identifican con respecto a SEQ ID NO: 31, SEQ ID
NO: 32 o SEQ ID NO: 33, en particular, no tiene ninguna
sustitución en la posición W33 en el dominio variable de la
cadena pesada y ninguna sustitución en las posiciones Y39, R55
y F60 en el dominio variable de la cadena ligera.

En la invención, los anticuerpos pueden producirse con

cualquier dominio constante de cadena pesada y cadena ligera.

En una realización, el anticuerpo anti-SIRPa humana de la invención es un anticuerpo monoclonal humanizado, en particular en el que el dominio constante de la cadena ligera del anticuerpo se deriva de un dominio constante de la cadena ligera kappa humana, más particularmente en el que el dominio constante de la cadena ligera consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 35, y en el que el dominio constante de cadena pesada del anticuerpo se deriva de un dominio constante de cadena pesada (de tipo salvaje o mutado) de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, en particular de un dominio constante de cadena pesada IgG4 humana, más particularmente en el que el dominio constante de la cadena pesada del anticuerpo consiste en la secuencia con SEQ ID NO: 34.

Como es bien conocido por un experto en la técnica, la elección de los isotipos de IgG del dominio constante de la cadena pesada se centra en si se requieren funciones específicas y la necesidad de una vida media *in vivo* adecuada. Por ejemplo, los anticuerpos diseñados para la erradicación selectiva de células cancerosas normalmente requieren un isotipo activo que permita la activación del complemento y la destrucción de células mediada por efector por citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos. Tanto los isotipos de IgG1 e IgG3 humanas (vida media más corta) cumplen con estos criterios, particularmente el isotipo de IgG1 humana (tipo salvaje y variantes). En particular, dependiendo del isotipo IgG del dominio constante de la cadena pesada (particularmente el isotipo de IgG1 de tipo salvaje y variantes humanas), el anticuerpo anti-SIRPa humana de la invención puede ser citotóxico para las células que expresan SIRPa a través de

un mecanismo de CDC, ADCC y/o ADCP (Salfeld, biotecnología de la naturaleza, vol. 25, No. 12, 2007; Irani et al. Inmunología molecular, vol. 67, número 2, parte A, 2015). De hecho, el fragmento cristalizable (Fc) interactúa con varias moléculas accesorias para modular funciones efectoras indirectas, como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Tabla 3. Ejemplos de un dominio constante de cadena pesada y un dominio constante de cadena ligera adecuados para los anticuerpos de acuerdo con la invención

Dominio constante de cadena pesada (IgG4m-S228P) SEQ ID NO: 34	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Dominio constante de cadena ligera (CLkappa) SEQ ID NO: 35	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPa, como se define anteriormente, que comprende:

- una cadena pesada comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 56, y
- una cadena ligera comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 57,
- o
- una cadena pesada comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 36, y

- una cadena ligera comprende o consiste en la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 43,

o

5 - una cadena pesada comprende o consiste en la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 37, y

- una cadena ligera comprende o consiste en la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 44,

o

10 - una cadena pesada comprende o consiste en la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 37, y

- una cadena ligera comprende o consiste en la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 45,

15 o

- una cadena pesada comprende o consiste en la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 38, y

20 - una cadena ligera comprende o consiste en la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 44,

o

25 - una cadena pesada comprende o consiste en la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 38, y

- una cadena ligera comprende o consiste en la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 45,

o

30 - una cadena pesada comprende o consiste en la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 39, y

- una cadena ligera comprende o consiste en la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 44,

o

- una cadena pesada comprende o consiste en la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 39, y

- una cadena ligera comprende o consiste en la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 45,

	- o - una cadena pesada comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 40, y - una cadena ligera comprende o consiste en la
5	secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 44,
	- o - una cadena pesada comprende o consiste en la
10	secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 40, y
	- una cadena ligera comprende o consiste en la
	secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 45,
	- o - una cadena pesada comprende o consiste en la
15	secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 41, y
	- una cadena ligera comprende o consiste en la
	secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 44,
	- o - una cadena pesada comprende o consiste en la
20	secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 41, y
	- una cadena ligera comprende o consiste en la
25	secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 45,
	- o - una cadena pesada comprende o consiste en la
	secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 42, y
30	- una cadena ligera comprende o consiste en la
	secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 44,
	- o - una cadena pesada comprende o consiste en la
	secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 42, y
	- una cadena ligera comprende o consiste en la
	secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 45.

Tabla 4. Secuencias de cadena pesada y cadena ligera de

anticuerpos específicos de acuerdo con la invención

5	Cadena pesada del anticuerpo de tipo salvaje (ratón 18D5)	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYVHWVKQR	SEQ ID NO: 56
		PIQGLEWIGNIDPSDS DTHYNQKFKDKASLTVDKSSSTAY	
		MQLSSSLTFEDSAVYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGT LVTVSA	
		AKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVT	
		WNSGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTV	
10		TCSVAHPASSTTVDKKLEPSGPISTINPCPPCKECKKCPA	
		PNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMI SLTPKVTCVVVDVSEDDP	
		DVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQ	
		DWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYIL	
		PPPAEQLSRKDVSLTCLVVG FNPGDISVEWTSNGHTEENY	
15		KDTAPVLDS DGSYFIYSK LNMKTSKWEKTD SFSCNVRHEG	
		LKNYYLKKTISRSPGK	
20	Cadena pesada del anticuerpo de tipo salvaje (quimérico 18D5)	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYVHWVKQR	SEQ ID NO: 36
		PIQGLEWIGNIDPSDS DTHYNQKFKDKASLTVDKSSSTAY	
		MQLSSSLTFEDSAVYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGT LVTVSA	
		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS	
		WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKT	
25		YTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV	
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD	
		GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	
		CKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK	
		NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS	
30	Cadena pesada de variante humanizada (HA)	DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKS	SEQ ID NO: 37
		LSLSPGK	
		EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYTFTSYVHWVRQM	
		PGKGLEWIGNIDPSDS DTHYNQKFKDHVTL SVDKSISTAY	
		LQLSSLKASDTAMY YCVRGGTGTMAWFAYWGQGT LVTVSS	
		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS	
		WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKT	
		YTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV	
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD	
		GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	
		CKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK	
		NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS	
		DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKS	
		LSLSPGK	

5	Cadena pesada de variante humanizada (HB)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVHWVRQM	SEQ ID NO:
		PGKGLEWMGNIDPSDSDTHYNQKFKDHVTLSDKSISTAY	38
		LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSS	
		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS	
		WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT	
10		YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV	
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD	
		GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	
		CKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK	
		NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS	
15	Cadena pesada de variante humanizada (HC)	DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS	
		LSLSPGK	
		EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVHWVRQM	SEQ ID NO:
		PGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDKSISTAY	39
		LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSS	
20		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS	
		WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT	
		YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV	
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD	
		GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	
25		CKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK	
		NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS	
		DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS	
		LSLSPGK	
30	Cadena pesada de variante humanizada (HE)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVHWVRQM	SEQ ID NO:
		PGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDKSISTAY	40
		LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSS	
		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS	
		WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT	
		YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV	
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD	
		GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	
		CKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK	
		NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS	
		DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS	
		LSLSPGK	

5	Cadena pesada de variante humanizada (HF)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVHWVRQM	SEQ ID NO:
		PGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDKSISTAY	41
		LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAYFAYWGQGTLVTVSS	
		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS	
		WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT	
10		YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV	
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD	
		GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	
		CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK	
		NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS	
15	Cadena pesada de variante humanizada (HEF)	DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS	
		LSLSPGK	
		EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVHWVRQM	SEQ ID NO:
		PGKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSDKSISTAY	42
		LQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTLAYFAYWGQGTLVTVSS	
20		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS	
		WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT	
		YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV	
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD	
		GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	
25		CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK	
		NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS	
		DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS	
		LSLSPGK	
30	Cadena ligera del anticuerpo de tipo salvaje (ratón 18D5)	DVVMQTPTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSYGNTYLYW	SEQ ID NO:
		YLQKPGQSPKLLIYRVSNRFGVPDRFSGSGSGTDFTLKI	57
		SRVEAEDLGVYFCFQGTHVPYTFGSGTKLEIKRADAAPT	
		SIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSR	
		QNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKEYERHNSYTCE	
30		ATHKTSTSPIVKSFNRNEC	
	Cadena ligera del anticuerpo de tipo salvaje (quimérico 18D5)	DVVMQTPTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSYGNTYLYW	SEQ ID NO:
		YLQKPGQSPKLLIYRVSNRFGVPDRFSGSGSGTDFTLKI	43
		SRVEAEDLGVYFCFQGTHVPYTFGSGTKLEIKRTVAAPSV	
		FIFPPSDEQLKSGTASVVCFLNNFYPREAKVQWKVDNALQ	
		SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE	
30	Dominio variable de cadena ligera de	VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
		DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYW	SEQ ID NO:
30		YQQRPGQSPRLLIYRVSNRFGVPDRFSGSGSGTDFTLKI	44

5	variante	SRVEAEDVGVIYFCFQGTHVPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSV	SEQ ID NO:
	humanizada A (LA)	FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
10	Dominio variable	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYW	45
	de cadena ligera de variante humanizada (LB)	FQQRPGQSPRLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVIYCFQGTHVPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, como se define anteriormente, que es capaz de inducir la diferenciación de células supresoras derivadas de mieloides monocíticas (Mo-MDSC) en células no supresoras.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, en el que dichas células no supresoras secretan citoquinas proinflamatorias tales como IL6, IL12 y TNF, y ninguna o bajo nivel de citoquinas antiinflamatorias tales como IL10 y TGFβ.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, en el que dichas células no supresoras expresan iNOS.

En una realización, la invención se relaciona con un

anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, en el que dichas células no supresoras no expresan los marcadores MHC de Clase II y expresan los marcadores CD80-CD86.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se define anteriormente, en el que dichas células no supresoras expresan al menos un marcador de las células asesinas naturales (NK).

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se define anteriormente, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es capaz de inhibir la polarización M2 de macrófagos y/o favorece a los macrófagos proinflamatorios tipo M1.

Los anticuerpos de la invención pueden modificar la polarización de los macrófagos para inducir un entorno proinflamatorio, es decir, pueden inhibir la señal antiinflamatoria proporcionada por los macrófagos de tipo M2 y/o favorecer la señal proinflamatoria proporcionada por los macrófagos de tipo M1. Este enfoque permite restablecer un entorno inflamatorio favorable a la acción de las células T efectoras, en particular para eliminar las células cancerosas.

ANTICUERPOS SIRPa

Las realizaciones citadas para los anticuerpos tal como se definieron anteriormente son *mutadis mutandis* repetidas a los anticuerpos citados en los otros aspectos de la invención.

5

En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se une específicamente a un epítoto conformacional que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR), SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN) y SEQ ID NO: 72 (SPRDITLKW) dentro de SIRPa.

10

15

En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se une específicamente a un epítoto conformacional que comprende o consiste en los péptidos de SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR), SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN) y SEQ ID NO: 72 (SPRDITLKW) dentro de SIRPa.

20

25

En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se une específicamente a un epítoto conformacional que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR) y SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN).

30

En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se une específicamente a un epítoto conformacional que comprende

o consiste en los péptidos de SEQ ID NO: 70 (ELIYNQKEGHFPR) y
SEQ ID NO: 71 (RNNMDFSIRIGN) dentro de SIRPa.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un
anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del
mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se
une específicamente a un epítipo conformacional que comprende
al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ
10 ID NO: 73 (YNQK) y SIR.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un
anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del
15 mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se
une específicamente a un epítipo conformacional que comprende
o consiste en los péptidos de SEQ ID NO: 73 (YNQK) y SIR dentro
de SIRPa.

20

En otro aspecto, la invención se relaciona con un
anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del
mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que
25 comprende:

a) una cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3,
y/o
30

b) una cadena ligera que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3,
en el que dichas CDR se definen como sigue:

- HCDR1 que comprende o consiste en un péptido de la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 (SYWVH),

- HCDR2 que comprende o consiste en un péptido de la
secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15 (NIDPSDSDTHYNQKFKD) o
SEQ ID NO: 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG),

- HCDR3 que comprende o consiste en un péptido de la

secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17 (GGTGTMAWFAY), SEQ ID NO: 18 (GGTGTLAWFAY), SEQ ID NO: 19 (GGTGTMAYFAY) o SEQ ID NO: 20 (GGTGTLAYFAY),

- LCDR1 que comprende o consiste en un péptido de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY),

- LCDR2 que comprende o consiste en un péptido de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22 (RVSNRFS), y

- LCDR3 que comprende o consiste en un péptido de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 (FQGTHVPYT).

La invención también se refiere a un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg, en particular que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y que no se une específicamente a las células T y que no inhibe la proliferación de las células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg.

APLICACIONES

En otro aspecto, la invención se refiere a:

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une

específicamente a SIRP_g y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g,

5 en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRP_a y que no se une específicamente a SIRP_g y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g.

10 para su uso como medicamento.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de:

15 - un anticuerpo anti-SIRP_a o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

20 - un anticuerpo anti-SIRP_a o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, que inhibe la unión de CD47 a SIRP_a y que no se une específicamente a SIRP_g y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g,

25 en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRP_a y que no se une específicamente a SIRP_g y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g.

30 La presente invención también se refiere al uso de:

- un anticuerpo anti-SIRP_a o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

En la fabricación de un medicamento.

En otro aspecto, la invención se refiere a:

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

para su uso en el tratamiento de cualquier afección susceptible de ser mejorada o prevenida mediante la diferenciación de células supresoras derivadas de mieloides monocíticas (Mo-MDSC) en células no supresoras.

Como se define en la presente memoria, "una condición susceptible de ser mejorada o prevenida al diferenciar las

células supresoras derivadas de mieloides monocíticas (Mo-MDSC) en células no supresoras" corresponde a un cáncer que incluye cánceres inflamatorios y cánceres con células mieloides infiltradas (en particular con MDSCs infiltradas. y/o células TAM), una enfermedad infecciosa, un traumatismo, una enfermedad autoinmune (como artritis reumatoide, diabetes tipo 1, lupus, psoriasis), una vacuna, una enfermedad inflamatoria crónica (como enfermedades inflamatorias del intestino, incluida la enfermedad de Crohn) y colitis ulcerosa), un shock séptico, una enfermedad infecciosa crónica (como Pseudomonas o CMV), fibrosis, aterosclerosis o disfunciones por trasplante.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de cualquier afección susceptible de mejoramiento o prevención mediante la diferenciación de células supresoras derivadas de mieloides monocíticas (Mo-MDSC) en células no supresoras en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de:

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación

de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g.

La presente invención también se refiere al uso de:

- un anticuerpo anti-SIRP_a o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

- un anticuerpo anti-SIRP_a o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, que inhibe la unión de CD47 a SIRP_a y que no se une específicamente a SIRP_g y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g,

en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRP_a y que no se une específicamente a SIRP_g y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g,

en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquier afección susceptible de ser mejorada o prevenida mediante la diferenciación de células supresoras derivadas de mieloides monocíticas (Mo-MDSC) en células no supresoras.

En una realización, la invención se refiere a:

- un anticuerpo anti-SIRP_a o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

- un anticuerpo anti-SIRP_a o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, que inhibe la unión de CD47 a SIRP_a y que no se une específicamente a SIRP_g y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g,

en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRP_a y que

no se une específicamente a SIRP α y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRP α ,

para su uso en el tratamiento de cualquier afección susceptible de ser mejorada o prevenida modificando la polarización de macrófagos a macrófagos proinflamatorios.

De hecho, SIRP α actúa como un inhibidor de punto de control y participa en la polarización de macrófagos. En particular, el bloqueo de SIRP α induce una función proinflamatoria de los macrófagos asociados a los macrófagos tipo 1 (M1 proinflamatorio = M (IFN γ)) e inhibe la actividad supresora de los macrófagos en el tumor, ya que se obtiene el perfil proinflamatorio de los macrófagos a expensas de los macrófagos tipo 2 (actividad fagocítica alta tipo M2 = M (IL4)). Por lo tanto, un antagonista de SIRP α es capaz de inhibir la polarización fenotípica M2 de los macrófagos y/o favorece la función proinflamatoria de los macrófagos de tipo M1 y puede usarse en terapéutica.

Como se define en la presente memoria, "una afección susceptible de ser mejorada o prevenida modificando la polarización de macrófagos para favorecer a los macrófagos proinflamatorios" corresponde por ejemplo a un cáncer sólido, un cáncer líquido, una enfermedad infecciosa, un traumatismo, una enfermedad autoinmune, una vacunación, una lesión cerebral, una lesión nerviosa, una policitemia, una hemocromatosis o una enfermedad inflamatoria crónica.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de cualquier afección susceptible de ser mejorada o prevenida modificando la polarización de

macrófagos a macrófagos proinflamatorios en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de:

5 - un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

10 - un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o
15 que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

 en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación
20 de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg.

En una realización, la invención también se refiere al uso de:

25 - un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

30 - un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o
 que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

 en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación
 de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquier afección susceptible de ser mejorada o prevenida modificando la polarización de macrófagos a macrófagos proinflamatorios.

5

La modificación de la polarización de los macrófagos para favorecer las células proinflamatorias puede ser útil en una serie de patologías o situaciones. Como se describió anteriormente, esta modificación es particularmente útil en el contexto de los cánceres, para restaurar una actividad antitumoral de los macrófagos y/o prevenir la actividad protumoral de los macrófagos de tipo M2. Las respuestas inmunes inadecuadas debidas a un exceso de polarización de macrófagos de tipo M2 también se producen en enfermedades infecciosas, fibrosis, vacunación, traumatismo y enfermedades inflamatorias crónicas.

10
15
20

Por lo tanto, de acuerdo con una realización particular, el anticuerpo anti-SIRPa se puede usar para tratar a un individuo que tiene un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cánceres de pulmón, cánceres de mesotelioma, cánceres de ovario, cánceres de hígado, cánceres de vejiga, cánceres de cerebro, cáncer de mama, cánceres de colon, sarcomas, cánceres de páncreas, cánceres de cabeza y cuello, cánceres de riñón, timomas, gliomas, melanomas y cánceres hematológicos como los linfomas (linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin), leucemias como Leucemia Linfoblástica Aguda o Crónica (ALL o CLL) de células T y B o Leucemia Mieloide Aguda o Crónica (AML o CML) y mielomas.

25
30

En una realización, la invención se refiere a:

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

5 - un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o
10 que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

 en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación
15 de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

 para su uso en el tratamiento de una patología seleccionada del grupo que consiste en un cáncer (en particular, cánceres inflamatorios y cánceres con células
20 mieloides infiltradas, en particular con MDSC infiltradas y/o células TAM), una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria crónica, una enfermedad enfermedad inmune, una enfermedad neurológica, una lesión cerebral, una lesión
25 nerviosa, una policitemia, una hemocromatosis, un traumatismo, un shock séptico, una enfermedad infecciosa crónica (como con Pseudomonas o CMV), fibrosis, aterosclerosis, obesidad, diabetes tipo II y una disfunción por trasplante.
30

 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una patología seleccionada del grupo que consiste en un cáncer (en particular cánceres inflamatorios y cánceres con células mieloides infiltradas, en particular con MDSC infiltradas y/o células TAM), una enfermedad infecciosa, enfermedad inflamatoria crónica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad neurológica, una lesión

cerebral, una lesión nerviosa, una policitemia, una hemocromatosis, un traumatismo, un shock séptico, una enfermedad infecciosa crónica (como con Pseudomonas o CMV), fibrosis, aterosclerosis, obesidad, diabetes tipo II y una
5 disfunción por trasplante en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de:

10 - un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

15 - un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

20 en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg.

25 En una realización, la invención se refiere al uso de:

30 - un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y que no se une

específicamente a células T y que no inhibe la proliferación de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g,

5 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una patología seleccionada del grupo que consiste en un cáncer (en particular, cánceres inflamatorios y cánceres con células mieloides infiltradas, particularmente con MDSCs infiltradas y/o células TAM), una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria crónica, una enfermedad autoinmune, 10 una enfermedad neurológica, una lesión cerebral, una lesión nerviosa, una policitemia, una hemocromatosis, un traumatismo, un shock séptico, una enfermedad infecciosa crónica (como con Pseudomonas o CMV), fibrosis, aterosclerosis, obesidad, 15 diabetes tipo II y disfunción por trasplante.

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRP_a humana o fragmento de unión a antígeno 20 del mismo o mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, para sus usos como se definió anteriormente, en el que dicho anticuerpo anti-SIRP_a humana o fragmento de unión a antígeno del mismo o mimético de 25 anticuerpo de unión a antígeno de la invención se administra a un paciente que presenta un tumor positivo a SIRP_a.

30 En una realización, la invención se refiere a:

- un anticuerpo anti-SIRP_a o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

- un anticuerpo anti-SIRP_a o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que inhibe la unión de CD47 a SIRP_a y que no se une específicamente a SIRP_g y/o que no se une específicamente a

células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g,

5 en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRP_a y que no se une específicamente a SIRP_g y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g,

Para su uso en vacunación.

10 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento de vacunación de un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de:

15 - un anticuerpo anti-SIRP_a o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

20 - un anticuerpo anti-SIRP_a o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que inhibe la unión de CD47 a SIRP_a y que no se une específicamente a SIRP_g y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g,

25 en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRP_a y que no se une específicamente a SIRP_g y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g.

30 En una realización, la invención se refiere al uso de:

- un anticuerpo anti-SIRP_a o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

- un anticuerpo anti-SIRP_a o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que inhibe la unión de CD47 a SIRP_a y que no se une específicamente a SIRP_g y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o

que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g,

en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRP_a y que no se une específicamente a SIRP_g y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRP_g,

para la fabricación de una vacuna.

Las células mieloides supresoras limitan la efectividad de la vacunación, especialmente en niños pequeños. Por lo tanto, un anti-SIRP_{a/g} limitaría el beneficio proporcionado por un anti-SIRP_a en la respuesta de la vacuna, evitando que los linfocitos T respondan a la vacunación.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se puede administrar en varias rutas adecuadas, por ejemplo, por vía intravenosa (IV), subcutánea (SC) o intramuscular (IM) al sujeto.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede administrarse solo o en combinación con otro agente terapéutico, por ejemplo, un segundo anticuerpo monoclonal humano o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otro ejemplo, el anticuerpo se administra junto con otro agente, por ejemplo, un agente inmunosupresor, un agente estimulante de la eritropoyesis (ESA), en combinación con composiciones celulares terapéuticas, y similares.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRP_a o fragmento de unión a antígeno del mismo o mimético de anticuerpo de unión a antígeno para su uso como se define anteriormente, en el que el anticuerpo anti-SIRP_a o fragmento de unión a antígeno se combina con un segundo agente terapéutico.

En particular, los anticuerpos anti-SIRPa de la presente invención se pueden combinar con algunas otras estrategias potenciales para superar los mecanismos de evasión inmune de tumores con agentes en desarrollo clínico o que ya se encuentran en el mercado (consulte la Tabla 1 de Antonia et al. Combinaciones de inmuno-oncología: una revisión de la experiencia clínica y las perspectivas futuras. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 6258-6268, 2014), para:

1. Revertir la inhibición de la inmunidad adaptativa (bloqueo de las vías de control de las células T), por ejemplo, usando un anti-CTLA4, un anti-PD1 o un anti-PD-L1 molécula;

2. Activar la inmunidad adaptativa (promoción de la señalización del receptor coestimulador de células T usando moléculas agonistas, en particular anticuerpos), por ejemplo, dirigiéndose a CD137 (4-1BB) usando moléculas agonistas que incluyen anticuerpos anti-CD137 (anti-4-1BB) agonistas o ligandos CD137 (4-1BB);

3. Mejorar la función de las células inmunes innatas;

4. Activar el sistema inmunológico (potenciando la función de la función efectora de células inmunológicas), por ejemplo a través de estrategias basadas en vacunas

La administración del segundo agente terapéutico puede ser simultánea o no con la administración del anticuerpo anti-SIRPa. Dependiendo de la naturaleza del segundo agente, se puede preparar una administración conjunta en forma de un medicamento combinado (producto), también conocido como "combo". Un combo es una combinación de dosis fija que incluye dos o más ingredientes farmacéuticos activos combinados en una forma de dosis única, que se fabrica y distribuye en dosis

fijas. Pero el régimen de dosis y/o la vía de administración también pueden diferir.

En una realización preferente, este segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en agentes quimioterapéuticos, agentes de radioterapia, agentes inmunoterapéuticos, agentes de terapia celular (tales como células CAR-T), antibióticos y probióticos.

En particular, los agentes inmunoterapéuticos útiles en el contexto de la invención se seleccionan del grupo que consiste en vacunas terapéuticas (vacunas de ADN, ARN o péptidos), bloqueadores o activadores de puntos de control inmunológicos, en particular células inmunológicas adaptativas (linfocitos T o B) o inmunoconjugados, tales como conjugados anticuerpo-fármaco.

Como se usa en la presente memoria, el término "agentes inmunoterapéuticos" se refiere en particular a los agentes que podrían tomar vacunas contra el cáncer de fenómenos biológicos interesantes a agentes terapéuticos efectivos que incluyen: factores de crecimiento de células T para aumentar el número y repertorio de células T vírgenes, factores de crecimiento para aumentar el número de células dendríticas (DC), agonistas para activar las DC y otras células presentadoras de antígenos (APC), adyuvantes para permitir y aumentar las vacunas contra el cáncer, agonistas para activar y estimular las células T, inhibidores del bloqueo del punto de control de las células T, factores de crecimiento de células T para aumentar el crecimiento y la supervivencia de las células T inmunes, agentes para inhibir, bloquear o neutralizar las células cancerosas y las citoquinas inmunosupresoras derivadas de

células inmunológicas.

Se conocen en la técnica numerosos bloqueadores o activadores de puntos de control inmunológicos. En el contexto de la invención, los ejemplos de bloqueadores de puntos de control inmunológicos o activadores de células inmunes adaptativas (linfocitos B o T) que podrían ser útiles son anti-PDL1, anti-PD1, anti-CTLA4, anti-CD137, anti-CD2, anti-CD28, anti-CD40, anti-HVEM, anti-BTLA, anti-CD160, anti-TIGIT, anti-TIM-1/3, anti-LAG-3, anti-2B4 y anti-OX40, anti-CD40, CD40-L, agonistas de TLR, anti-ICOS, ICOS-L y agonistas de los receptores de células B, en particular anti-PDL1, anti-PD1, anti-CD137.

Dicho agente inmunoterapéutico también puede ser un anticuerpo dirigido al antígeno tumoral, particularmente seleccionado del grupo que consiste en anti-Her2, anti-EGFR, anti-CD20, anti-CD19, anti-CD52.

El anticuerpo puede proporcionarse a una dosis efectiva de aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, o más. En realizaciones específicas, la dosis puede variar desde 1 µg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, opcionalmente desde 10 µg/kg hasta 10 mg/kg o desde 100 µg/kg hasta 5 mg/kg.

El término "dosis efectiva" o "dosificación efectiva" o "cantidad efectiva" se define como una cantidad suficiente para lograr, o al menos parcialmente lograr, el efecto deseado. El término "dosis efectiva" pretende abarcar una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece

la enfermedad. Las cantidades o dosis efectivas para este uso dependerán de la condición a tratar, la construcción del anticuerpo administrado, el contexto y los objetivos terapéuticos, la gravedad de la enfermedad, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al agente terapéutico, la vía de administración, el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño de órgano) y/o la condición (la edad y la salud general) del paciente, y el estado general del propio sistema inmunológico del paciente. La dosis adecuada se puede ajustar de manera que se pueda administrar al paciente una vez o durante una serie de administraciones, y para obtener el efecto terapéutico óptimo.

La dosificación para tales fines se puede repetir según sea necesario, por ejemplo, diario, semi-semanal, semanal, semestral, mensual o según sea necesario durante las recaídas.

En un aspecto, la invención también se refiere a:

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

para su uso en una prueba de diagnóstico, particularmente en medicina personalizada, más particularmente en una prueba de diagnóstico complementaria.

5

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico, particularmente en medicina personalizada, más particularmente en una prueba de diagnóstico complementaria, usando:

10

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

15

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

20

en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg .

25

En una realización, la invención se refiere al uso de:

30

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente, o

- un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y/o que no se une específicamente a células T y/o que no inhibe la proliferación de células T y/o que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

en particular, que inhibe la unión de CD47 a SIRPa y que no se une específicamente a SIRPg y que no se une específicamente a células T y que no inhibe la proliferación de células T y que no inhibe la unión de CD47 a SIRPg,

5 en la fabricación de un medicamento para una prueba de diagnóstico, particularmente en medicina personalizada, más particularmente en una prueba de diagnóstico complementaria.

10 En un aspecto, la invención también se refiere a un procedimiento de diagnóstico *in vitro* o *ex vivo*, en particular un procedimiento de diagnóstico adecuado para su uso en medicina personalizada, más particularmente en un diagnóstico
15 complementario, en el que un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de unión a antígeno de la invención se usa para la detección de células SIRPa+ en una muestra obtenida previamente de un sujeto y
20 opcionalmente para la cuantificación de la expresión de SIRPa.

En un aspecto, la invención también se refiere al uso de un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno
25 del mismo o un mimético de unión a antígeno de la invención, en la fabricación de un medicamento adecuado para su uso en una prueba de diagnóstico, en particular para su uso en medicina personalizada, o en una prueba de diagnóstico
30 complementaria.

En un aspecto, la invención también se refiere al uso de al menos un anticuerpo anti-SIRPa humana o fragmento de unión a antígeno del mismo o mimético de anticuerpo de unión a antígeno de la invención, como un medio para la determinación de la expresión y/o el nivel de expresión de SIRPa en una muestra biológica obtenida previamente de un individuo.

En un aspecto, la invención también se refiere a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para determinar células SIRPa positivas en un sujeto a partir de una muestra biológica previamente obtenida de dicho sujeto, que comprende:

i) determinar *in vitro* la expresión y/o el nivel de expresión de SIRPa, en una muestra biológica obtenida previamente de dicho sujeto usando el anticuerpo anti-SIRPa humana o fragmento de unión a antígeno del mismo o mimético de anticuerpo de unión a antígeno de la invención.

En un aspecto, la invención también se refiere al uso, en particular *in vitro* o *ex vivo*, de al menos un anticuerpo anti-SIRPa humana o fragmento de unión a antígeno del mismo o mimético de anticuerpo de unión a antígeno de la invención en un procedimiento en el que SIRPa se usa como un biomarcador que predice la respuesta a un tratamiento en un sujeto, en particular en un sujeto con cáncer.

En un aspecto, la invención también se refiere a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para predecir la respuesta de un sujeto con cáncer a un tratamiento, en particular con un anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno de la invención, que comprende:

- determinar el nivel de expresión de SIRPa en una muestra de tumor obtenida previamente de un sujeto, en particular con un anticuerpo anti-SIRPa humana o fragmento de unión a antígeno del mismo o mimético de anticuerpo de unión a antígeno de la invención, y

- comparar el nivel de expresión de SIRPa con un valor representativo de un nivel de expresión de SIRPa en una población de sujetos que no responden,

5 en el que un nivel de expresión más alto de SIRPa en la muestra de tumor del sujeto es indicativo para un sujeto que responderá al tratamiento.

10 En un aspecto, la invención también se refiere a un procedimiento de determinación *in vitro* o *ex vivo* de células SIRPa+ en una muestra obtenida previamente de un sujeto que comprende determinar la presencia de SIRPa como biomarcador que es predictivo para la respuesta de un sujeto a un
15 tratamiento, en particular una respuesta de un sujeto diagnosticado con un cáncer, en el que dicho procedimiento comprende:

20 - determinar el nivel de expresión de SIRPa en una muestra de tumor obtenida previamente de un sujeto, en particular con el anticuerpo anti-SIRPa humana o fragmento de unión a antígeno del mismo o mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se
25 define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y

- comparar el nivel de expresión de SIRPa con un valor representativo de un nivel de expresión de SIRPa en una población de sujetos que no responden,
30

en el que un nivel de expresión más alto de SIRPa en la muestra de tumor del sujeto es indicativo para un paciente que responderá al tratamiento.

COMPOSICIONES

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión

a antígeno del mismo como se definió anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en la presente memoria, una "composición farmacéutica" pretende abarcar una composición adecuada para la administración a un sujeto o paciente, tal como un mamífero, especialmente un humano. En general, una "composición farmacéutica" es estéril y generalmente está libre de contaminantes que son capaces de provocar una respuesta indeseable dentro del sujeto (por ejemplo, el(los) compuesto(s) en la composición farmacéutica es de calidad farmacéutica). Las composiciones farmacéuticas pueden diseñarse para la administración a sujetos o pacientes que lo necesiten a través de una serie de diferentes vías de administración que incluyen oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, intratraqueal y similares.

Como se usa en la presente memoria, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende abarcar un excipiente, diluyente, portador y adyuvante que son útiles en la preparación de una composición farmacéutica que generalmente es segura, no tóxica y no es biológicamente ni de otra manera indeseable e incluye un excipiente, diluyente, vehículo y adyuvante que son aceptables para uso veterinario, así como para uso farmacéutico en humanos. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente memoria, incluye uno y más de uno de tales excipientes, diluyentes, vehículos y adyuvantes.

En particular, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se definió anteriormente y un vehículo farmacéuticamente

aceptable.

PRODUCTOS DE COMBINACIÓN

5 En otro aspecto, la invención se refiere a un medio
terapéutico, en particular un producto de combinación, que
comprende como ingredientes activos: un anticuerpo anti-SIRPa
o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un agente
10 mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se definió
anteriormente y un segundo agente terapéutico, en el que dichos
ingredientes activos están formulados para terapia separada,
secuencial o combinada, en particular para uso combinado o
15 secuencial.

 En particular, la invención se refiere a un producto de
combinación que comprende un anticuerpo anti-SIRPa o un
20 fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de
anticuerpo de unión a antígeno como se definió anteriormente y
un segundo agente terapéutico para un uso simultáneo, separado
o secuencial de un medicamento.

25 En una realización, la invención se refiere a un producto
de combinación como se define anteriormente, en el que el
segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste
30 en agentes quimioterapéuticos, agentes de radioterapia,
agentes de terapia celular, agentes inmunoterapéuticos,
antibióticos y probióticos.

 En una realización, la invención se refiere a un producto
de combinación como se define anteriormente, en el que dicho
agente inmunoterapéutico se selecciona del grupo que consiste
en vacunas terapéuticas, bloqueadores o activadores del punto

de control inmunológico, en particular de células inmunológicas adaptativas (linfocitos T y B) y conjugados de anticuerpos-fármacos.

5

En una realización, la invención se refiere a un producto de combinación como se define anteriormente, en el que dicho bloqueador o activador del punto de control inmune de las células inmunes adaptativas (linfocitos T y B) se selecciona del grupo que consiste en anti-PDL1, anti-PD1, anti-CTLA4, anti-CD137, anti-CD2, anti-CD28, anti-CD40, anti-HVEM, anti-BTLA, anti-CD160, anti-TIGIT, anti-TIM-1/3, anti-LAG-3, anti-2B4, y anti-OX40, anti-CD40, CD40-L, agonistas de TLR, anti-ICOS, ICOS-L y agonistas de los receptores de células B, en particular seleccionados del grupo que consiste en anti-PDL1, anti-PD1 y anti CD137.

10

15

20

En una realización, dicho agente inmunoterapéutico es un anticuerpo dirigido contra el antígeno tumoral, seleccionado particularmente del grupo que consiste en anti-Her2, anti-EGFR, anti-CD20, anti-CD19, anti-CD52.

25

30

En un aspecto, la invención se relaciona con un producto de combinación como se define anteriormente, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de cualquier condición susceptible de ser mejorada o prevenida al diferenciar las células supresoras derivadas de mieloides monocíticas (Mo-MDSC) en células no supresoras.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de cualquier afección susceptible de ser mejorada o prevenida mediante la diferenciación de células supresoras derivadas de mieloides monocíticas (Mo-

MDSC) en células no supresoras en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente a dicho sujeto una cantidad efectiva de un producto de combinación como se define anteriormente.

5

En una realización, la invención se refiere al uso de un producto de combinación como se define anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquier afección susceptible de ser mejorada o prevenida mediante la diferenciación de células supresoras derivadas de mieloides monocíticas (Mo-MDSC) en células no supresoras.

10

15

En un aspecto, la invención se refiere a un producto de combinación como se define anteriormente, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de cualquier afección susceptible de ser mejorada o prevenida modificando la polarización de macrófagos a macrófagos proinflamatorios.

20

25

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de cualquier afección susceptible de ser mejorada o prevenida modificando la polarización de macrófagos a macrófagos proinflamatorios en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente a dicho sujeto una cantidad efectiva de un producto de combinación como se define anteriormente.

30

En una realización, la invención se refiere al uso de un producto de combinación como se define anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquier afección susceptible de ser mejorada o prevenida modificando la polarización de macrófagos a macrófagos proinflamatorios.

En un aspecto, la invención se relaciona con un producto de combinación como se define anteriormente, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una patología seleccionada del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria crónica, un autoinmune. enfermedad, una enfermedad neurológica, una lesión cerebral, una lesión nerviosa, una policitemia, una hemocromatosis, un traumatismo, un shock séptico, una enfermedad infecciosa crónica (como con Pseudomonas o CMV), fibrosis, aterosclerosis, obesidad, diabetes tipo II y una disfunción por trasplante o para su uso en vacunación.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una patología seleccionada del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria crónica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad neurológica, una lesión cerebral, una lesión nerviosa, una policitemia, una hemocromatosis, un traumatismo, un shock séptico, una enfermedad infecciosa crónica (como con Pseudomonas o CMV), fibrosis, aterosclerosis, obesidad, diabetes tipo II y una disfunción por trasplante de un sujeto que lo necesite y que comprende administrar simultáneamente por separado o secuencialmente a dicho sujeto, una cantidad efectiva de un producto de combinación como se definió anteriormente.

En una realización, la invención se refiere al uso de un producto de combinación como se definió anteriormente, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una patología seleccionada del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria crónica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad

neurológica, una lesión cerebral, una lesión nerviosa, una policitemia, una hemocromatosis, un traumatismo, un shock séptico, una enfermedad infecciosa crónica (como con Pseudomonas o CMV), fibrosis, aterosclerosis, obesidad, diabetes tipo II y disfunción por trasplante o para su uso en vacunación.

ÁCIDOS NUCLEICOS

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se definió anteriormente.

Como se usa en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria y monocatenaria, lineal y circular. Está comprendida preferentemente en un vector que está comprendido preferentemente en una célula huésped.

En una realización, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se definió anteriormente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en al menos una secuencia seleccionada de 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, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 69.

En una realización, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se definió anteriormente, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico:

- una secuencia que codifica el dominio variable de cadena pesada de dicho anticuerpo, que comprende preferentemente:

- 5
- SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 60,
 - SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 62, y
 - SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66,

10

y/o

- una secuencia que codifica el dominio variable de cadena ligera de dicho anticuerpo, que comprende preferentemente:

- 15
- SEQ ID NO: 67,
 - SEQ ID NO: 68, y
 - SEQ ID NO: 69.

20

Tabla 5. Secuencias que codifican las CDR de los dominios variables de la cadena pesada y las CDR de los dominios variables de la cadena ligera de anticuerpos de acuerdo con la invención

25

30	Secuencia de ácido nucleico que codifica HCDR1 (que corresponde con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14)	AGCTATTGGGTGCAC	SEQ ID NO: 58
		TCTTATTGGGTGCAC	SEQ ID NO: 59
		TCCTATTGGGTGCAC	SEQ ID NO: 60
	Secuencia de ácido nucleico que codifica HCDR2 (que corresponde con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15)	AACATCGACCCCAGCGACTCTGATA CCCATTACAATCAGAAGTTTAAGGA C	SEQ ID NO: 61

5	Secuencia de ácido nucleico que codifica HCDR2 (que corresponde con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16)	AACATCGACCCCAGCGACTCTGATA CACACTACTCCCCTAGCTTTCAGGG C	SEQ ID NO: 62
	Secuencia de ácido nucleico que codifica HCDR3 (que corresponde con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17)	GGAGGAACCGGAACAATGGCTTGGT TTGCTTAC	SEQ ID NO: 63
10	Secuencia de ácido nucleico que codifica HCDR3 (que corresponde con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18)	GGAGGAACCGGCACACTGGCTTGGT TCGCTTAC	SEQ ID NO: 64
15	Secuencia de ácido nucleico que codifica HCDR3 (que corresponde con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19)	GGAGGAACCGGAACAATGGCTTACT TCGCTTAT	SEQ ID NO: 65
	Secuencia de ácido nucleico que codifica HCDR3 (que corresponde con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20)	GGAGGAACCGGCACACTGGCTTACT TCGCTTAT	SEQ ID NO: 66
20	Secuencia de ácido nucleico que codifica LCDR1 (que corresponde con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21)	AGGTCCAGCCAGTCCCTGGTGCACA GCTATGGCAACACATACCTGTAT	SEQ ID NO: 67
25	Secuencia de ácido nucleico que codifica LCDR2 (que corresponde con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22)	AGGGTGTCTAATCGGTTCTCC	SEQ ID NO: 68
	Secuencia de ácido nucleico que codifica LCDR3 (que corresponde con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23)	TTTCAGGGCACCCATGTGCCATACA CA	SEQ ID NO: 69

En particular, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52,

Tabla 6. Secuencias que codifican los dominios variables de cadena pesada y los dominios variables de cadena ligera de anticuerpos de acuerdo con la invención

10	Secuencia de ácido nucleico que codifica Dominio variable de cadena pesada del anticuerpo de tipo salvaje (quimérico y ratón 18D5)	CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCTGAGCTGGTGAG	SEQ ID NO: 46
		GCCTGGCTCCAGCGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTAGCG	
		GCTACACCTTCACAAGCTATTGGGTGCACTGGGTGAAG	
		CAGCGGCCAATCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACAT	
		CGACCCAGCGACTCTGATACCCATTACAATCAGAAGT	
15		TTAAGGACAAGGCCTCTCTGACCGTGGATAAGTCTTCC	
		AGCACAGCTTATATGCAGCTGTCTTCCCTGACATTCGA	
		GGATTCCGCCGTGTACTATTGCGTGAGGGGAGGAACCG	
		GAACAATGGCTTGGGTTTGCTTACTGGGGCCAGGGCACC	
		CTGGTGACAGTGTCTGCT	
20	Secuencia de ácido nucleico que codifica Dominio variable de cadena pesada de variante humanizada (HA)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCTGAGGTGAAGAA	SEQ ID NO: 47
		GCCAGGCGAGTCTCTGAGGATCTCCTGCAAGGCTAGCG	
		GCTACACCTTCACATCTTATTGGGTGCACTGGGTGCGG	
		CAGATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACAT	
		CGACCCTAGCGACTCTGATACCCCTACAATCAGAAGT	
25		TTAAGGACCATGTGACCCTGTCTGTGGATAAGTCCATC	
		AGCACAGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGCCTC	
		CGATACAGCTATGTACTATTGCGTGAGGGGAGGAACCG	
		GAACAATGGCTTGGGTCGCTTACTGGGGCCAGGGCACC	
		CTGGTGACAGTGTCTTCC	
30	Secuencia de ácido nucleico que codifica Dominio variable de cadena pesada de variante humanizada (HB)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCTGAGGTGAAGAA	SEQ ID NO: 48
		GCCAGGCGAGTCTCTGAGGATCTCCTGCAAGGCTTCTG	
		GCTACTCCTTCACCAGCTATTGGGTGCACTGGGTGCGG	
		CAGATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACAT	
		CGACCCTAGCGACTCTGATACACACTACAATCAGAAGT	
		TTAAGGACCATGTGACCCTGAGCGTGGATAAGTCCATC	
		AGCACAGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGCCTC	
		TGATACCGCTATGTACTATTGCGTGAGGGGAGGAACCG	
		GAACAATGGCTTGGGTCGCTTACTGGGGCCAGGGCACC	
		CTGGTGACAGTGTCTTCC	
	Secuencia de ácido nucleico que	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAA	SEQ ID NO: 49
		GCCAGGCGAGAGCCTGAGGATCTCTTGCAAGGCTAGCG	

5	codifica Dominio variable de cadena pesada de variante humanizada (HC)	GCTACTCTTTACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGG CAGATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACAT CGACCCCAGCGACTCTGATACACACTACTCCCCTAGCT TTCAGGGCCATGTGACCCTGTCCGTGGACAAGTCTATC TCCACAGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGCCAG CGATACCGCTATGTACTATTGCGTGAGGGGAGGAACCG GAACAATGGCTTGGTTCGCTTACTGGGGCCAGGGCACC CTGGTGACAGTGTCTTCC	
10	Secuencia de ácido nucleico que codifica Dominio variable de cadena pesada de variante humanizada (HE)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAA GCCAGGCGAGAGCCTGAGGATCTCTTGCAAGGCTAGCG GCTACTCTTTACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGG CAGATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACAT CGACCCCAGCGACTCTGATACACACTACTCCCCTAGCT TTCAGGGCCATGTGACCCTGTCCGTGGACAAGTCTATC TCCACAGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGCCAG CGATACCGCTATGTACTATTGCGTGAGGGGAGGAACCG GCACACTGGCTTGGTTCGCTTACTGGGGCCAGGGCACC CTGGTGACAGTGTCTTCC	SEQ ID NO: 50
15			
20	Secuencia de ácido nucleico que codifica Dominio variable de cadena pesada de variante humanizada (HF)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAA GCCAGGCGAGAGCCTGAGGATCTCTTGCAAGGCTAGCG GCTACTCTTTACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGG CAGATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACAT CGACCCCAGCGACTCTGATACACACTACTCCCCTAGCT TTCAGGGCCATGTGACCCTGTCCGTGGACAAGTCTATC TCCACAGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGCCAG CGATACCGCTATGTACTATTGCGTGAGGGGAGGAACCG GAACAATGGCTTACTTCGCTTATTGGGGCCAGGGCACC CTGGTGACAGTGTCTTCC	SEQ ID NO: 51
25			
30	Secuencia de ácido nucleico que codifica Dominio variable de cadena pesada de variante humanizada (HEF)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAA GCCAGGCGAGAGCCTGAGGATCTCTTGCAAGGCTAGCG GCTACTCTTTACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGG CAGATGCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACAT CGACCCCAGCGACTCTGATACACACTACTCCCCTAGCT TTCAGGGCCATGTGACCCTGTCCGTGGACAAGTCTATC TCCACAGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTGAAGGCCAG CGATACCGCTATGTACTATTGCGTGAGGGGAGGAACCG GCACACTGGCTTACTTCGCTTATTGGGGCCAGGGCACC	SEQ ID NO: 52

86		
5		CTGGTGACAGTGTCTTCC
	Secuencia de ácido	GACGTGGTCATGACCCAGACACCACTGAGCCTGCCCCGT
	nucleico que	GTCCCTGGGCGATCAGGCCTCTATCTCCTGCAGGTCCA
	codifica Cadena	GCCAGTCCCTGGTGCACAGCTATGGCAACACATACCTG
	ligera del	TATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCCAAGCT
10	anticuerpo de tipo	GCTGATCTACAGGGTGTCTAATCGGTTCTCCGGCGTGC
	salvaje (quimérico y ratón 18D5)	CTGACAGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGATTTC
		ACACTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGACCTGGG
		CGTGTATTTCTGTTTTTCAGGGCACCCATGTGCCATACA
		CATTTGGCTCTGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
15	Secuencia de ácido	GACGTGGTCATGACACAGAGCCCACTGTCTCTGCCTGT
	nucleico que	GACCCTGGGACAGCCAGCCTCTATCTCCTGCAGGTCCA
	codifica Dominio	GCCAGTCCCTGGTGCACAGCTATGGCAACACATACCTG
	variable de cadena	TATTGGTACCAGCAGAGGCCCGGACAGAGCCCAAGGCT
	ligera de variante	GCTGATCTACAGGGTGTCTAATCGGTTCTCCGGCGTGC
20	humanizada A (LA)	CTGACAGGTTTAGCGGCTCTGGCTCCGGCACCGATTTC
		ACACTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGG
		CGTGTATTTCTGTTTTTCAGGGCACCCATGTGCCATACA
		CATTTGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
25	Secuencia de ácido	GACGTGGTCATGACACAGAGCCCACTGTCTCTGCCTGT
	nucleico que	GACCCTGGGACAGCCAGCCTCTATCTCCTGCAGGTCCA
	codifica Dominio	GCCAGTCCCTGGTGCACAGCTACGGCAACACATACCTG
	variable de cadena	TATTGGTTCCAGCAGAGGCCCGGACAGAGCCCAAGGCT
	ligera de variante	GCTGATCTATAGGGTGTCTAATCGGTTCTCCGGCGTGC
30	humanizada (LB)	CTGACAGGTTTAGCGGATCTGGATCCGGAACCGACTTC
		ACCCTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGG
		CGTGTA CTATTGTTTCCAGGGCACCCATGTGCCATACA
		CATTTGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

VECTORES

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente.

Como se usa en la presente memoria, un "vector" es una

molécula de ácido nucleico que se usa como vehículo para transferir material genético a una célula. El término "vector" abarca plásmidos, virus, cósmidos y cromosomas artificiales. En general, los vectores diseñados comprenden un origen de replicación, un sitio de multiclonación y un marcador seleccionable. El vector en sí es generalmente una secuencia de nucleótidos, comúnmente una secuencia de ADN, que comprende un inserto (transgén) y una secuencia más grande que sirve como la "estructura fundamental" del vector. Los vectores modernos pueden abarcar características adicionales además del inserto de transgén y un esqueleto: promotor, marcador genético, resistencia a antibióticos, gen informador, secuencia de direccionamiento, etiqueta de purificación de proteínas. Los vectores denominados vectores de expresión (construcciones de expresión) son específicamente para la expresión del transgén en la célula objetivo, y generalmente tienen secuencias de control.

CÉLULAS HUÉSPED

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula huésped aislada que comprende un vector como se define anteriormente.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "célula huésped" pretende incluir cualquier célula individual o cultivo celular que pueda ser o haya recibido vectores, moléculas de ácido nucleico exógeno y polinucleótidos que codifiquen el constructo de anticuerpo de la presente invención; y/o receptores del propio constructo de anticuerpo. La introducción del material respectivo en la célula puede llevarse a cabo por medio de transformación, transfección y similares. El término

"célula huésped" también pretende incluir la progenie o la progenie potencial de una sola célula. Las células huésped adecuadas incluyen células procarióticas o eucariotas, y también incluyen pero no se limitan a bacterias, células de levadura, células de hongos, células de plantas y células animales tales como células de insectos y células de mamíferos, por ejemplo, de murinos, ratas, conejos, macacos o seres humanos.

KITS

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende:

- un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se definió anteriormente,
- una molécula de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo o unión a antígeno,
- un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico, y/o
- una célula que comprende dicho vector.

Por motivos de conveniencia, el anticuerpo de la presente invención se puede proporcionar en un kit, es decir, una combinación de reactivos envasados.

En el contexto de la presente invención, el término "kit" significa dos o más componentes (uno de los cuales corresponde al anticuerpo o unión a antígeno del mismo, la molécula de ácido nucleico, el vector o la célula de la invención) envasados juntos en un contenedor, recipiente o similar. Por lo tanto, un kit puede describirse como un conjunto de productos y/o utensilios que son suficientes para lograr un determinado objetivo, que puede comercializarse como una sola

unidad.

El kit puede comprender uno o más recipientes (tales como viales, ampollas, recipientes, jeringas, botellas, bolsas) de cualquier forma, tamaño y material apropiados que contengan el constructo de anticuerpo de la presente invención en una dosis apropiada para la administración. El kit puede contener además instrucciones de uso (por ejemplo, en forma de folleto o manual de instrucciones), medios para administrar el constructo de anticuerpo de la presente invención, como una jeringa, bomba, infusor o similares, medios para reconstituir el constructo de anticuerpo de la invención y/o medios para diluir el constructo de anticuerpo de la invención.

En una realización, la invención se refiere a un kit como se define anteriormente para una unidad de administración de dosis única. El kit de la invención también puede contener un primer receptor que comprende un constructo de anticuerpo liofilizado y seco y un segundo receptor que comprende una formulación acuosa. En ciertas realizaciones de la presente invención, se proporcionan kits que contienen jeringas precargadas de una sola cámara y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas líquidas y liojeringas).

ANTÍGENOS

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido, en particular un antígeno, comprende o consiste en la secuencia del epítipo de SIRPa humana que consiste en SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E).

En una realización, la invención se refiere a un

polipéptido, en particular un antígeno, comprende o consiste en la secuencia del epítipo de SIRPa humana que consiste en SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), dicho polipéptido tiene un tamaño de hasta 300 aminoácidos.

5

En una realización, el polipéptido de la invención tiene un tamaño entre 50 y 300, preferentemente entre 100 y 250 aminoácidos.

10

En una realización, el polipéptido de la invención tiene un tamaño de hasta 50, 100, 150, 200, 250 o 300 aminoácidos.

15

En una realización, la invención se relaciona con un polipéptido, en particular un antígeno, comprende o consiste en la secuencia del epítipo de SIRPa humana que consiste en SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E) y al menos una secuencia del epítipo de SIRPa humana que consiste en SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSRPDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) o SEQ ID NO: 6).

20

En una realización, la invención se relaciona con un polipéptido, en particular un antígeno, que comprende o consiste en las secuencias de epítopos de SIRPa humana que consiste en SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSRPDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) y SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLTWLE).

25

En una realización, la invención se refiere a un polipéptido, en particular un antígeno, que comprende o consiste en al menos un péptido seleccionado del grupo que

30

consiste en SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72, dicho polipéptido consiste en una secuencia de hasta 300 aminoácidos.

5 En una realización, la invención se refiere a un polipéptido, en particular un antígeno, que comprende o consiste en el péptido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 73 (YNQK) y/o el péptido de la secuencia de aminoácidos SIR dentro de SIRPa, dicho polipéptido consiste en
10 una secuencia de hasta 300 aminoácidos.

PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN DE UN ANTICUERPO

15 En un aspecto, la invención también se refiere a un procedimiento para fabricar un anticuerpo, en particular un anticuerpo de la invención, que comprende inmunizar un animal no humano, en particular un mamífero no humano, contra al menos
20 un antígeno como se define anteriormente, y en particular, recolectar el suero resultante de dicho animal no humano inmunizado para obtener anticuerpos dirigidos contra dicho antígeno.

25 En particular, la invención también se refiere a un procedimiento para fabricar un anticuerpo que comprende inmunizar a un animal no humano contra un antígeno comprende o
30 consiste en la secuencia del epítipo de SIRPa humana que consiste en SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), y en particular recolectar el suero resultante de dicho animal no humano inmunizado para obtener anticuerpos dirigidos contra dicho antígeno.

En particular, la invención también se refiere a un procedimiento para fabricar un anticuerpo que comprende

inmunizar a un animal no humano contra un antígeno comprende o consiste en la secuencia del epítopo de SIRPa humana que consiste en SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E) y al menos una secuencia del epítopo de SIRPa humana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) o SEQ ID NO: 6 (YPQRLQLQL), y en particular recolectar el suero resultante de dicho animal no humano inmunizado para obtener anticuerpos dirigidos contra dicho antígeno.

En particular, la invención también se refiere a un procedimiento para fabricar un anticuerpo que comprende inmunizar a un animal no humano contra un antígeno que comprende o consiste en las secuencias de epítopo de SIRPa humana que consiste en SEQ ID NO: 1 (SLIPVGP), SEQ ID NO: 2 (G/ARELIYNQKEGH), SEQ ID NO: 3 (KFRKGSPD[DV]/[T]E), SEQ ID NO: 4 (QHTVSFTCESHGFSPRDITLKWF), SEQ ID NO: 5 (ICEVAHVTLQG) y SEQ ID NO: y en particular recolectar el suero resultante de dicho animal no humano inmunizado para obtener anticuerpos dirigidos contra dicho antígeno.

PROCEDIMIENTO PARA SELECCIONAR UN ANTICUERPO

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para seleccionar un anticuerpo de la invención, un fragmento de unión a antígeno o mimético de dicho anticuerpo, que comprende o consiste en al menos uno de las siguientes etapas:

a) probar (por ejemplo, de acuerdo con un procedimiento descrito en los Ejemplos 1, 2 y 3) la capacidad de un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o mimético de tal anticuerpo para unirse a SIRPa, en particular a un antígeno

como se definió anteriormente,

b) probar (por ejemplo, de acuerdo con un procedimiento descrito en los Ejemplos 7 y 8) la capacidad de un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o mimético de tal anticuerpo para unirse a SIRPb,

c) probar (por ejemplo, de acuerdo con un procedimiento descrito en los Ejemplos 9 y 10) la capacidad de un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o mimético de tal anticuerpo para unirse a SIRPg,

d) probar (por ejemplo, de acuerdo con un procedimiento descrito en los Ejemplos 4 y 5) la capacidad de un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o mimético de tal anticuerpo para inhibir la unión de CD47 humana a SIRPa humana;

e) probar (por ejemplo, de acuerdo con un procedimiento descrito en el Ejemplo 12) la capacidad de un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o mimético de tal anticuerpo para unirse a células T;

f) probar (por ejemplo, de acuerdo con un procedimiento descrito en el Ejemplo 13) la capacidad de un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o mimético de tal anticuerpo para inhibir la proliferación de células T;

g) probar (por ejemplo, de acuerdo con un procedimiento descrito en el Ejemplo 11) la capacidad de un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o mimético de tal anticuerpo para inhibir la unión de CD47 humana a SIRPg humana;

y opcionalmente comprende la siguiente etapa:

- seleccionar un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o un mimético de dicho anticuerpo que se une específicamente a SIRPa, en particular a un antígeno como se definió anteriormente, y que inhibe significativamente la unión de CD47 a SIRPa, y que no se une específicamente a humanos SIRPg, y/o que no se une específicamente a células T humanas,

y/o que no inhibe significativamente la proliferación de células T humanas, y/o que no inhibe significativamente la unión de CD47 humana a SIRP_g humana; más particularmente que se une específicamente a SIRP_a, en particular a un antígeno como se definió anteriormente, y que inhibe significativamente la unión de CD47 a SIRP_a, y que no se une específicamente a SIRP_g humana, y que no se une específicamente a células T humanas, y que no inhibe significativamente la proliferación de células T humanas, y que no inhibe significativamente la unión de CD47 humana a SIRP_g humana.

El procedimiento para seleccionar un anticuerpo de la invención puede realizarse ventajosamente además del procedimiento para fabricar un anticuerpo de acuerdo con la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las siguientes Figuras y Ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo realizar y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni pretenden representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Si bien la presente invención se ha descrito con referencia a las realizaciones específicas de la misma, los expertos en la técnica deberían entender que se pueden realizar varios cambios y se pueden sustituir los equivalentes sin apartarse del verdadero espíritu y ámbito de la invención. Además, pueden hacerse muchas modificaciones para adaptar una situación particular, material, composición de la materia, proceso, etapa o etapas

del proceso, al objetivo, espíritu y ámbito de la presente invención. Se pretende que todas estas modificaciones estén dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

5

Figura 1. Análisis de unión de los anticuerpos anti-SIRPa mediante un ensayo ELISA (recubrimiento de SIRPa-His humano y detección de kappa anti-humana).

10

Evaluación por ELISA en SIRPa-His inmovilizada de quimérico (◆), HALA (□), HFLA (*), HFLB (+), HEFLA (▲), HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (o) en la **Figura A**; de HCLA (•), HCLB (x), HELA (◇), HELB (-) en la **Figura B**; de HALB (-), HBLA (—), HBLB (■) en la **Figura C**. La revelación se realizó con un anticuerpo antihumano de burro y se reveló por colorimetría a 450 nm usando un sustrato TMB. ED50 es la concentración del anticuerpo indicado para alcanzar el 50 % de la señal en este ensayo. Unión del clon m18D5 (■) (n = 4), clon comercial SE5A5 (▲) (n = 7), clon 6G10 (∇) (n = 3) y clon 12D7 (□) (n = 4) en la **Figura D**.

25

Figura 2. Análisis de afinidad por Biacore de anticuerpos anti-SIRP en proteína recombinante de SIRPa humana.

30

La proteína recombinante SIRPa-His se inmovilizó en un chip CM5 a 5 µg/ml (500RU) y los anticuerpos indicados se agregaron a diferentes concentraciones. Los valores se midieron después de un período de asociación (ka) de 3min seguido de un período de disociación de 10 min (kd) para determinar la constante de afinidad (KD).

Figura 3. Análisis de unión de anticuerpos anti-SIRPa en monocitos humanos (homocigotos para la variante 1 de SIRPa

(v1/v1)).

(A, B) Evaluación mediante citofluorometría en monocitos humanos v1/v1 (previamente teñidos con anticuerpo inhibidor de la unión al receptor Fc humano) de quiméricos (◆), HALA (□), HFLA (*), HFLB (+), HEFLA (▲), HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (o). La revelación se realizó con un mAb Fc antihumano de ratón marcado con PE en un citómetro CantoII, valores correspondientes al porcentaje de monocitos teñidos. ED50 es la concentración del anticuerpo indicado para alcanzar el 50 % de la señal en este ensayo. La **Figura A** corresponde al porcentaje de monocitos v1/v1 teñidos. La **Figura B** corresponde a la intensidad media de fluorescencia (MFI) de los monocitos v1/v1.

(C, D) Estudio de unión de anticuerpos contra SIRPa en monocitos humanos por citometría de flujo (FACS): se probaron diferentes anticuerpos anti-SIRPa: m18D5 (■) (n = 1), SE7C2 (▲) (n = 2), 12D7 (□) (n = 2), 6G10 (◆) (n = 4): La **Figura C** representa la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de los diferentes anticuerpos en una respuesta de dosis. La **Figura D** representa el porcentaje de monocitos teñidos sobre la respuesta a la dosis de anticuerpos. El análisis estadístico se realizó cuando fue posible.

(E, F, G) Variantes de SIRPa que se unen en la población mediante anticuerpos anti-h SIRPa: La capacidad de diferentes anticuerpos anti-hSIRPa para unirse a variantes de SIRPa en los 32 voluntarios se midió mediante FACS con una IgG anti-ratón PE. Todos los clones se analizaron a 10 µg/ml: m18D5 (■), 12D7 (▼), 6G10 (◆) y anticuerpos comerciales SE5A5 (□), SE7C2 (Δ). La **Figura E** representa los voluntarios de la Variante 1

homocigota (n = 16). La **Figura F** representa los voluntarios de la Variante 2 homocigota (n = 8). La **Figura G** representa los voluntarios de V1/V2 heterocigotas (n = 8).

5

Figura 4. Competencia de anticuerpos anti-SIRPa con CD47 en SIRPa.

10

(A) Evaluación por ELISA en SIRPa-His inmovilizado de quiméricos (♦), HFLA (*), HFLB (+), HEFLA (▲), HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (o) a diferentes concentraciones incubadas con concentración constante de CD47-Fc biotinilada (6 µg/ml). La revelación se realizó con estreptavidina peroxidasa para detectar la molécula CD47 y se reveló mediante colorimetría a 450 nm usando un sustrato TMB. Los resultados de un segundo experimento se dan con los valores de IC50. IC50 es la concentración del anticuerpo indicado para inhibir el 50 % de la señal en este ensayo.

15

20

25

30

(B) Estudio de actividad antagonista de los anticuerpos anti-SIRPa en la interacción SIRPa-CD47 por ELISA: Los diferentes anticuerpos anti-SIRPa se probaron en una respuesta a la dosis: clon m18D5 (■) (n = 1), anticuerpo comercial SE5A5 (▲) (n = 2) y m12D7 (□) (n = 2). La **Figura** representa el porcentaje de interacciones positivas para CD47 SIRPa-CD47 medidas por ELISA durante una respuesta de dosis de anticuerpos anti-hSIRPa.

Figura 5. Competencia de anticuerpos anti-SIRPa con CD47 en monocitos humanos.

(A, B) Evaluación por citometría en monocitos humanos (v1/v1) de quiméricos (♦), HFLA (*), HFLB (+), HEFLA (▲), HEFLB

(■) a diferentes concentraciones incubadas con concentración constante de CD47-Fc biotinilada (10 µg/ml). La revelación se realizó con FicoEritrina-estreptavidina para detectar la molécula CD47 y se reveló mediante un citómetro CantoII. IC50 es la concentración del anticuerpo indicado para inhibir el 50 % de la señal en este ensayo. La **Figura A** corresponde al porcentaje de células positivas. La **Figura B** corresponde a la intensidad media de fluorescencia.

(C) Estudio de la actividad antagonista de los anticuerpos anti-SIRPa en la interacción Sirpa-CD47 por FACS: Los diferentes anticuerpos anti-SIRPa se probaron en una respuesta a la dosis: clon m18D5 (■) (n = 1), anticuerpo comercial SE7C2 (▲) (n = 2) y m12D7 (□) (n = 2). La **Figura C** representa el porcentaje de células positivas para CD47 medidas por FACS después de la competencia con anticuerpos anti-hSIRPa.

Figura 6. (A) Análisis de afinidad por Blitz del anticuerpo anti-SIRP en la proteína recombinante SIRPa humana preincubada o no con ligando SP-D. La proteína recombinante SIRPa-His se inmovilizó en un biosensor NINTA a 10 µg/ml y el ligando SP-D se añadió a 100 µg/ml (concentración de saturación). Luego, se añadió anticuerpo anti-SIRPa a 20 µg/ml y los valores de afinidad se dedujeron después de un período de asociación (ka) de 120 segundos, seguido de un período de disociación de 120 segundos (kd) para determinar la constante de afinidad (KD). (B) Análisis de afinidad por Blitz del anticuerpo anti-SIRP en la proteína recombinante SIRPa humana preincubada con anticuerpo 18D5 de ratón. La proteína recombinante SIRPa-His se inmovilizó en un biosensor NINTA a 10 µg/ml y el anticuerpo anti-SIRPa se añadió a 20 µg/ml (concentración de saturación). Luego se añadió el ligando SP-

D a 100 $\mu\text{g/ml}$ y los valores de afinidad se dedujeron después de un período de asociación (k_a) de 120 segundos, seguido de un período de disociación de 120 segundos (k_d) para determinar la constante de afinidad (K_D).

5

Figura 7. (A) Análisis de afinidad por Blitz de anticuerpos anti-SIRP en proteína recombinante SIRPb humana.

10

La proteína recombinante SIRPb-His se inmovilizó en un biosensor NINTA y los anticuerpos indicados se agregaron a 20 $\mu\text{g/ml}$. Los valores se dedujeron después de un período de asociación (k_a) de 120 segundos, seguido de un período de disociación de 120 segundos (k_d) para determinar la constante de afinidad (K_D). **(B)** Análisis de unión de anticuerpos anti-

15

SIRP (recubrimiento de SIRPb-His humana y detección de kappa anti-humana). Evaluación por ELISA en SIRPb-His inmovilizada de HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (o), B4B6 (◆) y control de Ab de IgG4 (■). La revelación se realizó con un anticuerpo anti-

20

humano de burro con la excepción de B4B6 revelado con un anticuerpo de ratón y revelado por colorimetría a 450 nm usando un sustrato TMB.

25

Figura 8. (A) Análisis de afinidad por Blitz de anticuerpos anti-SIRP en proteína recombinante SIRPg humana.

30

La proteína recombinante SIRPg-His se inmovilizó en un biosensor NINTA y los anticuerpos indicados se agregaron a 10 $\mu\text{g/ml}$. Los valores se dedujeron después de un período de asociación (k_a) de 120 segundos, seguido de un período de disociación de 120 segundos (k_d) para determinar la constante de afinidad (K_D). **(B)** Análisis de unión mediante ensayo ELISA de anticuerpos anti-SIRP en SIRPg (recubrimiento de SIRPg-His humana y detección de kappa anti-humana). Evaluación por ELISA en SIRPg-His inmovilizada de HEFLB (■), SIRP29 (Δ), Kwar23 (o), LSB2-20 (●) y control de Ab de IgG4 (■). La revelación se

realizó con un anticuerpo antihumano de burro y se reveló mediante colorimetría a 450 nm usando un sustrato TMB.

Figura 9. Análisis de afinidad por Blitz de CD47 en proteína recombinante SIRPg humana preincubada con anticuerpos anti-SIRP. La proteína recombinante SIRPg-His se inmovilizó en un biosensor NINTA a 10 µg/ml y los anticuerpos indicados se agregaron a 20 µg/ml (concentración de saturación). Luego, se agregó CD47Fc a 100 µg/ml y los valores de afinidad se dedujeron después de un período de asociación (k_a) de 120 segundos, seguido de un período de disociación de 120 segundos (k_d) para determinar la constante de afinidad (K_D).

Figura 10. Intensidad media de fluorescencia geométrica medida por citometría de flujo en **(A)** linfocitos T CD3+ humanos periféricos, **(B)** glóbulos rojos o **(C)** plaquetas después de teñir con diferentes anticuerpos monoclonales y revelar con anticuerpo fluorescente anti-IgG secundario.

Figura 11. Porcentaje de células T CD3+ humanas periféricas positivas después de la tinción con diferentes anticuerpos monoclonales. La tabla indica el valor del % de células positivas en experimentos duplicados.

Figura 12. Células T humanas aisladas de células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos se estimularon con **(A)** **(C)** perlas anti-CD3+ anti-CD28 en una proporción de 1:1 durante 3 días o **(B)** **(D)** con células dendríticas (DC) alogénicas en una proporción de células T 5:1 DC durante 5 días o **(E)** con diferentes concentraciones de derivado proteico no purificado de tuberculina (PPD) durante 5 días. Se añadieron anticuerpos en el día 0 del cultivo. La

proliferación se midió mediante la incorporación de H^3 -timidina durante las últimas 12 horas de cultivo.

Figura 13. Se aislaron células T CD8+ de ratón a partir de esplenocitos de ratones sin tratamiento previo. Las células T CD8 se estimularon con perlas anti-CD3+ anti-CD28 en una proporción de 1:1 durante 3 días. Se añadieron anticuerpos en el día 0 del cultivo. La proliferación se midió mediante la incorporación de H^3 -timidina durante las últimas 12 horas de cultivo.

Figura 14. Células T humanas aisladas de células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos se estimularon con células dendríticas (DC) alogénicas en una proporción de células T 5:1 DC durante 5 días. Se añadieron anticuerpos en el día 0 del cultivo. La proliferación se midió mediante la incorporación de H^3 -timidina durante las últimas 12 horas de cultivo.

Figura 15. (A) Efecto antitumoral administración i.p. de anti-SIRPa (clon P84) tres veces a la semana durante 4 semanas (300 μ g/inyección) en combinación o no con dos inyecciones (día 4 y 8) de mAb anti-4-1-BB (clon 3H3, 100 μ g/inyección) o con inyecciones (dos veces a semana) de anti-PDL-1 (clon 10F.9G2, 200 μ g/inyección, tratamiento durante 4 semanas) en un modelo ortotrópico de hepatoma murino ($2,5 \times 10^6$ de células Hepa 1.6 inyectadas a través de la vena porta en el día 0). Los ratones fueron considerados curados cuando sobrevivieron tres veces más tiempo del tiempo necesario para que todos los ratones de control murieran. **(B)** Las células infiltrantes de tumores se analizaron el día 13 después de la inoculación del tumor. **(C)** Las células infiltrantes de tumores y las células de bazo se analizaron el día 13 después de la inoculación del tumor. **(D)**

Ratones curados previamente en el modelo de hepatoma mediante inyección anti-SIRPa+ anti-4-1BB o ratones mutantes SIRPa tratados con anti-4-1BB se volvieron a exponer mediante inyección de células Hepa 1.6 en el bazo ($2,5 \times 10^6$ células/ratón). Se inyectaron ratones sin tratamiento previo en paralelo en la misma ruta para comparar el desarrollo de tumores con ratones reexpuestos. Los ratones entonces se dejaron sin tratamiento. **(E)** Los ratones curados previamente en el modelo de hepatoma con anti-SIRPa+ anti-4-1BB se volvieron a exponer mediante la inyección de Hepa 1.6 células en el bazo ($2,5 \times 10^6$ células/ratón) y su bazo se recogió 30 días después de la reexposición. Se aislaron esplenocitos y esplenocitos de células T. Los ratones no tratados se inyectaron por vía intravenosa con vehículo, esplenocitos completos (10×10^6 /ratón) o células T purificadas a partir de esplenocitos ($2,5 \times 10^6$ /ratón) y todos recibieron inyección de células Hepa 1.6 en el bazo ($2,5 \times 10^6$ células/ratón). Los ratones entonces se dejaron sin tratamiento y se consideraron curados cuando sobrevivieron tres veces más tiempo del tiempo necesario para que todos los ratones de control murieran.

Figura 16. Ratones curados previamente en el modelo de hepatoma mediante inyección anti-SIRPa+ anti-PDL1 se volvieron a exponer mediante inyección de células Hepa 1.6 en el bazo ($2,5 \times 10^6$ células/ratón). Se inyectaron ratones sin tratamiento previo en paralelo en la misma ruta para comparar el desarrollo de tumores con ratones reexpuestos. Los ratones entonces se dejaron sin tratamiento.

Figura 17. Efecto antitumoral de administración i.p. de anti-SIRPa (clon P84) tres veces por semana durante 4 semanas ($200 \mu\text{g}$ /inyección) en un modelo ortotópico de carcinoma mamario

murino ($0,25 \times 10^6$ de células 4T1 inyectadas en la glándula mamaria). El desarrollo del tumor se evaluó midiendo el diámetro del tumor y se calculó de acuerdo con la fórmula: $= (0,52 * (d^2))^{1,5}$. Los ratones se sometieron a eutanasia cuando el desarrollo del tumor era de casi 1000 mm^3 de acuerdo con las pautas éticas.

Figura 18. Análisis de fenotipo de células inmunológicas en bazo, tumor y ganglios linfáticos de ratones tratados con anti-SIRPa (clon P84) o ctrl mAb i.p. tres veces por semana durante dos semanas ($200 \mu\text{g}/\text{inyección}$) en un modelo ortotrópico de carcinoma mamario murino ($0,25 \times 10^6$ de células 4T1 inyectadas en la glándula mamaria). El análisis de células inmunes se realizó dos semanas después de la inoculación del tumor.

Figura 19. Anti-SIRPa (clon P84), anti-CD47 (clon MIAP410) y control de isotipo irrelevante se administraron por vía intraperitoneal el día 0 y el día 2 a 12 mg/kg en ratones C57Bl/6. Las muestras de sangre se recogieron el día 0 y el día 3 en tubos que contenían EDTA y se realizó un hemograma con un analizador de hematología XS-800i (Sysmex). El nivel de hemoglobina (izquierda) y el porcentaje de hematocrito (derecha) se evaluaron el día 3. Las líneas de puntos representan valores de rango normal en los ratones C57Bl/6 para cada parámetro.

Figura 20. (Arriba) Análisis de citometría de flujo de mAb anti-SIRPa (HEFLB, gris) y anti-CD47 (B6H12, negro) en comparación con un mAb de control (línea punteada) en plaquetas humanas recién aisladas de la sangre de donantes sanos. (Abajo) Medición de agregación plaquetaria humana mediante agregómetro óptico en presencia de $50 \mu\text{g/ml}$ de mAb de control, anti-SIRPa

(HEFLB), anti-CD47 (B6H12) o anti-integrina α IIb como control positivo del inhibidor de agregación. Los anticuerpos se evaluaron en plaquetas no activadas y activadas por ADP.

Figura 21. Se cultivaron células T CD4+ alogénicas en una proporción 1:1 con células mieloides CD14+ extraídas de ascitis de cáncer de ovario **(A)** fresco o **(B)** congelado con 10 μ g/ml de anticuerpo de control (blanco), anti-SIRPa HEFLB (negro) o mAb anti-CD47 (gris). La proliferación se midió el día 5 por incorporación de ^{3} H-timidina. (C) Alternativamente, las células T alogénicas se cultivaron en una proporción de 5:1 con células dendríticas alogénicas y una proporción diferente de células mieloides CD14+ extraídas de ascitis de cáncer de ovario en presencia de 10 μ g/ml de anticuerpo como en **(A)**.

EJEMPLOS

En los siguientes Ejemplos, el anticuerpo "18D5" (o "m18D5") corresponde al anticuerpo de ratón 18D5, el anticuerpo "quimérico" corresponde al anticuerpo quimérico ratón/humano 18D5, y los anticuerpos "HALA, HALB, HBLA, HBLB, HCLA, HCLB, HELA, HELB, HFLA, HFLB, HEFLA y HEFLB" corresponden a variantes específicas de 18D5 humanizadas. Los anticuerpos 6G10 y 12D7 pertenecen al solicitante; estos anticuerpos se han obtenido por el mismo procedimiento que m18D5 y se usan como control. Estos anticuerpos de control son anticuerpos monoclonales anti-SIRPa humanas de ratón IgG2a.

Además, se usaron anticuerpos comerciales para comparación. El primero es un anticuerpo anti-SIRPa, llamado SE7C2 (Santa Cruz sc-23863); el segundo anticuerpo es un anticuerpo capaz de reconocer tanto SIRP α/β y se llama SE5A5

(BioLegend BLE323802); y el tercero es un anticuerpo anti-SIRPa humana llamado Kwar23 (Creative Biolabs). Un anticuerpo anti-SIRPa humana llamado SIRP29 de la Universidad de Toronto descrito en la solicitud PCT WO2013056352 también se usó para la comparación.

Ejemplo 1. Análisis de unión de los anticuerpos anti-SIRPa en SIRPa por ELISA

Procedimiento: La actividad de unión de los anticuerpos anti-SIRPa se evaluó mediante ELISA. Para el ensayo ELISA con el anticuerpo quimérico, se inmovilizaron los anticuerpos humanizados, SIRP29 y Kwar23, un hSIRPa recombinante (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 11612-H08H) sobre plástico a 0,5 µg/ml en tampón carbonato (pH 9,2) y se añadió el anticuerpo purificado para medir la unión. Después de la incubación y el lavado, se añadió IgG antihumana de burro marcada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch; EE. UU.; referencia 709-035-149) y se reveló mediante procedimientos convencionales.

Para el ensayo ELISA con los anticuerpos de ratón, se inmovilizó un hSIRPa recombinante (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 10975-H08H) sobre plástico a 0,5 µg/ml en tampón de carbonato (pH 9,2) y se añadió el anticuerpo purificado para medir Unión. Después de la incubación y el lavado, se añadió la cadena Fc anti-ratón de cabra marcada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch; referencia 115-036-071) y se reveló mediante procedimientos convencionales.

Resultados: como se muestra en la **Figura 1A, 1B y 1C**, la actividad de unión de los diferentes anticuerpos anti-SIRPa en SIRPa medida por ELISA mostró concentraciones efectivas (EC50)

de 2,9 ng/ml para el anticuerpo quimérico, 3,9 ng/ml para HALA, 5,1 ng/ml para HFLA, 4,0 ng/ml para HFLB, 7,1 ng/ml para HEFLA, 4,4 ng/ml de HEFLB en un primer experimento, 4,06 ng/ml para el anticuerpo quimérico, 5,60 ng/ml para HCLA, 5,59 ng/ml para HCLB, 4,61 ng/ml para HELA, 4,13 ng/ml para HELB en un segundo experimento y 2,74 ng/ml para el anticuerpo quimérico, 2,53 ng/ml para HALB, 2,68 ng/ml para HBLA, 2,95 ng/ml para HBLB en un tercer experimento. Esos resultados indican que los anticuerpos de la invención probados son buenos aglutinantes de SIRPa por ELISA en comparación con otros anticuerpos anti-SIRPa conocidos SIRP29 (3,7 ng/ml) y Kwar23 (3,3 ng/ml). Esos resultados indican que el epítipo reconocido por todos los anticuerpos de la invención es accesible cuando SIRPa está recubierto en un pocillo de plástico.

Como se muestra en la **Figura 1D**, la actividad de unión de diferentes anticuerpos anti-SIRPa en SIRPa medida por ELISA mostró una dosis efectiva (ED50) de 0,16nM (24ng/ml) para SE5A5 y 0,06nM (9ng/ml) para el clon m18D5. Los clones 6G10 y 12D7 no parecieron unirse a SIRPa mediante el ensayo ELISA. Esos resultados indican que el clon m18D5 es un buen ligante de SIRPa por ELISA en comparación con un anticuerpo comercial e indica que el epítipo reconocido por este clon es accesible cuando SIRPa está recubierto en un pozo de plástico en comparación con los clones 6G10 y 12D7.

Ejemplo 2. Medición de la afinidad del biosensor de los anticuerpos anti-SIRPa para SIRPa

Procedimiento: Se inmovilizó hSIRPa recombinante (Sino

Biologicals, Beijing, China; referencia 11612-H08H) en un chip sensor CM5 (GeHealthcare; Francia) a 5 µg/ml (500RU) y los anticuerpos se aplicaron a diferentes concentraciones con un caudal de 40 µl/min. El análisis se realizó con un BIAcore 3000 (Biacore, GeHealthcare). Los valores se midieron después de un período de asociación (k_a) de 3 minutos seguido de un período de disociación de 10 minutos (k_d) para determinar la constante de afinidad (K_D).

Resultados: como se muestra en la **Figura 2**, los anticuerpos de la invención tienen una fuerte afinidad (K_D) por SIRPa (de $1,93 \times 10^{-10}$ M a $3,67 \times 10^{-10}$ M), que es equivalente a la afinidad de los anticuerpos SIRP29 y Kwar23 anti-SIRPa conocidos y mejor que la afinidad de los anticuerpos comerciales anti-SIRPa SE7C2 y SE5A5.

Ejemplo 3. Ensayo de unión de SIRPa en monocitos humanos por citofluorometría

Procedimiento: Para medir la unión de los anticuerpos anti-SIRPa en monocitos humanos, se añadió por primera vez inhibidor de la unión al receptor Fc humano (BD pharmingen; EE. UU., referencia 564220) durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear los receptores Fc humanos en monocitos humanos para reducir el fondo. Luego, se incubó un anticuerpo durante 30 minutos a 4 °C, y se lavó antes de teñir 30 minutos a 4 °C con Fc de IgG anti-humana marcado con PE (Biolegend; EE. UU., referencia 409303). Para los anticuerpos de ratón, se usó un anti-IgG de ratón marcado con PE (Jackson ImmunoResearch; referencia 715-116-151). Las muestras se analizaron en el citofluorómetro BD LSRII o Canto II.

Resultados: como se muestra en la **Figura 3**, los resultados indican una fuerte unión de los anticuerpos anti-SIRPa de la invención en monocitos humanos y una unión de aglutinante (según lo medido con la MFI (Intensidad Media de Fluorescencia)) que los conocidos anticuerpos anti-SIRPa Kwar23, SE7C2 y SE5A5.

Ejemplo 4. Análisis competitivo entre CD47 y los anticuerpos anti-SIRPa mediante un ensayo ELISA antagonista

Procedimiento: Para el ensayo ELISA competitivo, se inmovilizó hSIRPa recombinante (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 11612-H08H) sobre plástico a 0,5 µg/ml en tampón de carbonato (pH 9,2). Para el anticuerpo quimérico, los anticuerpos humanizados, SIRP29 y Kwar23, un anticuerpo purificado (a diferentes concentraciones) se mezcló con 6 µg/ml final (concentración fija) de CD47Fc humana biotinilada (AcroBiosystems interchim; Francia; referencia: #CD7-H82F6) para medir la unión competitiva durante 2h a 37 °C. Después de la incubación y el lavado, se agregó estreptavidina marcada con peroxidasa (Vector laboratoring; EE. UU.; referencia SA-5004) para detectar la unión de Biotina-CD47Fc y se reveló mediante procedimientos convencionales.

Para los anticuerpos de ratón, se mezcló un anticuerpo purificado (en diferentes concentraciones) con 0,04 µg/ml de CD47Fc (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 12283-H02H) para medir la unión competitiva durante 2 horas a 37 °C. Después de la incubación y el lavado, se añadió la cadena de Fc antihumana de burro marcada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch; referencia 709-035-149) para detectar la unión a CD47Fc y se reveló mediante procedimientos convencionales.

Resultados: Como se muestra en la **Figura 4**, los anticuerpos de la invención tienen una actividad antagonista en la interacción SIRPa-CD47. En particular, se observa que el anticuerpo quimérico, HFLA, HFLB, HEFLA y HEFLB tienen una mejor actividad antagonista en comparación con la actividad antagonista de SIRP29 y el anticuerpo comercial anti-SIRPa SE5A5.

Ejemplo 5. Análisis competitivo entre CD47 y los anticuerpos anti-SIRPa humanizados en monocitos humanos mediante el ensayo de citofluorometría antagonista

Procedimiento: Para medir la competencia entre CD47 y los anticuerpos anti-SIRPa humanizados en monocitos humanos, se añadió un anticuerpo purificado en monocitos durante 15 minutos a 4 °C, luego se mezcló con 5 µg/ml final de CD47Fc humano biotinilado (AcroBiosystems Interchim; Francia; referencia: #CD7-H82F6) y se incubó durante 30 minutos a 4 °C para medir el anticuerpo de unión competitiva. Después de la incubación y el lavado, se añadió estreptavidina marcada con PE (BDBiosciences; EE. UU.; referencia 554061) durante 15 minutos a 4 °C para detectar la unión de Biotin-CD47Fc y se analizó en el citofluorómetro BD LSRII o Canto II.

Para medir la competencia entre CD47 y los anticuerpos anti-hSIRPa de ratón en monocitos humanos, se añadió un anticuerpo purificado en monocitos durante 15 minutos a 4 °C, luego se mezcló con 5 µg/ml final de CD47Fc (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 12283 -H02H) y se incubó durante 15 min a 4 °C para medir el anticuerpo de unión competitiva. Después de la incubación y el lavado, se añadió Fc antihumano

marcado con FITC (Beckman Coulter; referencia IM1627) durante 15 minutos a 4 °C para detectar la unión a CD47Fc y se analizó en el citofluorómetro BD LSRII o Canto II.

5

Resultados: Como se muestra en la **Figura 5**, los anticuerpos de la invención tienen una actividad antagonista en la interacción SIRPa-CD47 en monocitos humanos.

10

Ejemplo 6. Competencia del procedimiento Blitz con SP-D

Procedimiento: Este procedimiento se realizó con un Blitz (Forté Bio; EE. UU.; referencia C22-2 No 61010-1).

15

Condición A: SIRPa+ anticuerpo anti-SIRPa+ proteína tensioactivo D (SP-D). En una primera etapa, la proteína recombinante SIRPa (His) (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 11612-H08H) se inmovilizó a 10 µg/ml mediante una cola de histidina en un biosensor Ni-NTA (Forté Bio; EE. UU.; referencia 18-0029) durante 30 segundos. En una segunda etapa, se agregaron anticuerpos anti-SIRPa a 20 µg/ml (concentración de saturación) durante 120 segundos. Luego, el SP-D humano (Ret D Systems; EE. UU.; referencia 1920-SP-050) se asoció a 100 µg/ml, en competencia con anticuerpos anti-SIRPa, durante 120 segundos. La disociación de SP-D se realizó en tampón cinético durante 120 segundos. El análisis de los datos se realizó con el software Blitz pro 1.2, que calculó la constante de asociación (k_a) y la constante de disociación (k_d) y determinó la constante de afinidad K_D (k_a/k_d).

20

25

30

Condición B: SIRPa+ proteína tensioactivo D (SP-D) + anticuerpo anti-SIRPa. En una primera etapa, la proteína recombinante Sirp-a (His) (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 11612-H08H) se inmovilizó a 10 µg/ml mediante una

cola de histidina en un biosensor Ni-NTA (Forté Bio; EE. UU.; referencia 18-0029) durante 30 segundos. En una segunda etapa, se añadió SP-D humano (R et D Systems; EE. UU.; referencia 1920-SP-050) a 100 µg/ml durante 120 segundos. Luego, los anticuerpos anti-SIRPa se asociaron a 20 µg/ml (concentración de saturación) durante 120 segundos. La disociación del anticuerpo anti-SIRPa se realizó en tampón cinético durante 120 segundos. Los datos de análisis se realizaron con el software Blitz pro 1.2, que calculó la constante de asociación (k_a) y la constante de disociación (k_d) y determinó la constante de afinidad K_D (k_a/k_d).

Resultados: Como se muestra en la **Figura 6**, la unión del anticuerpo anti-SIRPa 18D5 no bloquea la unión de SP-D a SIRPa y la unión de SP-D no bloquea la unión de 18D5 a SIRPa. Por lo tanto, el anticuerpo de la invención no inhibe la interacción entre SIRPa y SP-D.

Ejemplo 7. Afinidad de los anticuerpos anti-SIRPa para SIRPb por el procedimiento de Blitz

Procedimiento: Este procedimiento se realizó con un Blitz (Forté Bio; EE. UU.; referencia C22-2 No 61010-1). Se inmovilizó hSIRPb-His recombinante (Anticuerpos en línea; EE. UU.; referencia ABIN3077231) a 10 µg/ml con una cola de histidina en un biosensor Ni-NTA (Forté Bio; EE. UU.; referencia 18-0029) durante 30 segundos. Luego, se asoció un anticuerpo anti-SIRPa a 20 µg/ml durante 120 segundos. La disociación del anticuerpo anti-SIRPa se realizó en tampón cinético durante 120 segundos. El análisis de los datos se realizó con el software Blitz pro 1.2, que calculó la constante de asociación (k_a) y la constante de disociación (k_d) y

determinó la constante de afinidad KD (ka/kd).

Resultados: Como se muestra en la **Figura 7A**, los anticuerpos de la invención tienen una menor afinidad por SIRPb en comparación con SIRPa. En particular, se observa que el anticuerpo quimérico, HFLA, HFLB, HEFLA, HEFLB tienen una afinidad reducida por SIRPb en comparación con SIRP29 y Kwar23.

Ejemplo 8. Unión de ELISA de anticuerpos anti-SIRP en SIRPb

Procedimiento: Para el ensayo ELISA de actividad, se inmovilizó hSIRPb-His recombinante (Anticuerpos en línea; EE. UU.; referencia ABIN1466557) sobre plástico a 1 µg/ml en tampón de carbonato (pH 9,2) y se agregó un anticuerpo purificado para medir la unión. Después de la incubación y el lavado, se añadió IgG antihumana de burro marcada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch; EE. UU.; referencia 709-035-149) y se reveló mediante procedimientos convencionales.

Resultados: como se muestra en la **Figura 7B**, los anticuerpos anti-SIRPa tienen una baja afinidad por SIRPb. Debe indicarse que la revelación se realizó con un anticuerpo anti-humano de burro para todos los anticuerpos excepto para B4B6 (revelado con un anticuerpo de ratón), lo que puede explicar que la señal obtenida para el anticuerpo B4B6 anti-SIRPb es más baja que la señal obtenida. Para los anticuerpos anti-SIRPa.

Ejemplo 9. Análisis de afinidad de los anticuerpos anti-SIRPa para SIRPg por el procedimiento de Blitz

Procedimiento: Este procedimiento se realizó con un Blitz (Forté Bio; EE. UU.; referencia C22-2 No 61010-1). Se inmovilizó hSIRPg-His recombinante (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 11828-H08H) a 10 µg/ml por la cola de histidina en un biosensor Ni-NTA (Forté Bio; EE. UU.; referencia 18-0029) durante 30 segundos. Luego, se asoció un anticuerpo anti-SIRPa a 20 µg/ml durante 120 segundos. La disociación del anticuerpo anti-SIRPa se realizó en tampón cinético durante 120 segundos. El análisis de los datos se realizó con el software Blitz pro 1.2, que calculó la constante de asociación (k_a) y la constante de disociación (k_d) y determinó la constante de afinidad K_D (k_a/k_d).

Resultados: Como se muestra en la **Figura 8A**, los anticuerpos anti-SIRPa de la invención tienen una baja afinidad por SIRPg. Esta afinidad es ligeramente más débil que la afinidad de los anticuerpos anti-SIRPa conocidos SIRP29 y Kwar23. Sin embargo, las propiedades cinéticas difieren entre los anticuerpos anti-SIRPa, SIRP29 y Kwar23, con una constante de alta tasa de disociación (K_d) para los anticuerpos anti-SIRPa en comparación con SIRP29 y Kwar23. En particular, HFLB tiene la afinidad más baja para SIRPg con un valor K_D de $1,036 \times 10^{-7}$ M que equivale a una diferencia de 2 logs en comparación con los valores K_D de SIRP29 y Kwar23.

Ejemplo 10. Unión de ELISA de los anticuerpos anti-SIRP en SIRPg

Procedimiento: Para el ensayo ELISA de actividad, se inmovilizó hSIRPg-His (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 11828-H08H) sobre plástico a 1 µg/ml en tampón de carbonato (pH 9,2) y se añadió anticuerpo purificado para medir

la unión. Después de la incubación y el lavado, se añadió IgG antihumana de burro marcada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch; EE. UU.; referencia 709-035-149) y se reveló mediante procedimientos convencionales.

5

Resultados: como se muestra en la **Figura 8B**, el anticuerpo anti-SIRPa HEFLB no se une a SIRPg, mientras que los anticuerpos anti-SIRPa conocidos SIRP29 y Kwar23 muestran una

10

unión significativa a SIRPg.

Ejemplo 11. Competencia del procedimiento de Blitz con CD47 para SIRPg: SIRPg + anticuerpo anti-SIRPa+ CD47

15

Procedimiento: Este procedimiento se realizó con un Blitz (Forté Bio; EE. UU.; referencia C22-2 No 61010-1). En una primera etapa, se inmovilizó hSIRPg-His (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 11828-H08H) a 10 µg/ml por la cola de histidina en un biosensor de Ni-NTA (Forté Bio; EE. UU.; referencia 18-0029) durante 30 segundos. En una segunda etapa, se añadió un anticuerpo anti-SIRPa a 20 µg/ml (concentración de saturación) durante 120 segundos. Luego, se asoció CD47Fc humano (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 12283-H02H) a 100 µg/ml, en competencia con anticuerpos anti-SIRPa, durante 120 segundos. La disociación de CD47Fc se realizó en un tampón cinético durante 120 segundos. Los datos de análisis se realizaron con el software Blitz pro 1.2, que calculó la constante de asociación (k_a) y la constante de disociación (k_d) y determinó la constante de afinidad K_D (k_a/k_d).

20

25

30

Resultados: Como se muestra en la **Figura 9**, el HEFLB anti-SIRPa de la invención no compete con la unión de CD47 a SIRPg. Por el contrario, los otros anticuerpos conocidos SIRP29 y, en

particular, kwar23 compiten con la unión de CD47 a SIRP α .

Ejemplo 12. Unión a las células sanguíneas por citometría de flujo

5

Procedimiento: El experimento se realizó para analizar la unión de los anticuerpos anti-SIRP α en las células sanguíneas humanas. Se extrajeron linfocitos T positivos para CD3, glóbulos rojos y plaquetas de sangre purificada de voluntarios sanos. Las células se tiñeron luego durante 30 minutos a 4 °C con 10 microgramos/ml de cada anticuerpo analizado, se lavaron y luego se tiñeron con un anticuerpo anti-IgG fluorescente secundario durante otros 30 minutos a 4 °C. Después de los lavados, las células se analizaron en un citómetro de flujo CANTO II (BD Bioscience).

20

Resultados: como se muestra en la **Figura 10**, las células T, los glóbulos rojos y las plaquetas son positivas para CD47, que se expresa de forma ubicua, y se tiñeron con el anticuerpo B6H12. Los anticuerpos SIRP29 y Kwar23, como LSB2.20 (anticuerpo anti-SIRP γ específico), se unen a las células T que se conocen por expresar SIRP γ . Sin embargo, el anticuerpo anti-SIRP α humanizado 18D5 no se une a las células T (se obtuvieron los mismos resultados con cuatro diferentes variantes humanizadas de 18D5 probadas). Los glóbulos rojos y las plaquetas no expresan SIRP α y, por lo tanto, no se revelaron con el anticuerpo 18D5 humanizado y los otros anticuerpos anti-SIRP α . Este resultado muestra la especificidad del anticuerpo 18D5 humanizado para SIRP α en células vivas en comparación con los anticuerpos anti-SIRP α conocidos.

30

Como se muestra en la **Figura 11**, las células T no se tiñen

con el anticuerpo 18D5 humanizado (se obtienen los mismos resultados con cinco variantes humanizadas de 18D5 diferentes) y con el 18D5 quimérico (datos no mostrados), mientras que más del 70 % de las células T se tiñen Por SIRP29 y Kwar23.

5

Ejemplo 13. Proliferación de células T CD3+ humanas

10

Procedimiento: se aislaron hPBMC de una capa lustrosa de voluntarios sanos. Las células T CD4 o CD8 se seleccionaron mediante selección positiva usando un AutoMACS (Miltenyi) y se sembraron en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo).

15

Las señales proliferativas fueron proporcionadas por microperlas recubiertas con anti-CD3/anti-CD28 (LifeTechnologies) en una perla de 1 T para 1 célula T durante

20

tres días, o células dendríticas alógenas maduras generadas *in vitro* en una célula 5 T durante 1 mDC durante 5 días o con diferentes concentraciones de derivado proteico no purificado de tuberculina (PPD) durante 5 días. Se agregaron anticuerpos

25

dirigidos a la vía SIRPa/CD47 desde el inicio de la prueba de proliferación a una concentración de saturación (10 µg/ml). La proliferación se midió mediante la incorporación de H³-timidina durante las últimas 12 horas de cultivo.

30

Resultados: como se muestra en la **Figura 12**, las variantes del anticuerpo anti-SIRPa HALA y HEFLB no inhiben la proliferación de células T cuando las células T se estimulan con cuentas anti-CD3+ anti-CD28 **(A)** **(C)** o con células dendríticas alogénicas **(B)** **(D)** o con PPD **(E)**, mientras que el anti-SIRPa Kwar23 inhibe la proliferación de células T cuando las células T se estimulan con células dendríticas alogénicas. Como se esperaba, los anticuerpos anti-CD47 y el anticuerpo anti-SIRPg son inhibidores de la proliferación de células T.

Ejemplo 14. Proliferación de células T CD8+ de ratón

Procedimiento: Se aislaron esplenocitos de ratones sin
tratamiento previo. Las células T CD8 se seleccionaron mediante
selección positiva usando un AutoMACS (Miltenyi) y se sembraron
en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las señales
proliferativas fueron proporcionadas por microperlas
recubiertas con anti-CD3/anti-CD28 (LifeTechnologies) en una
cuenta de 1 cuenta por 1 célula T durante tres días. Se
agregaron un anticuerpo anti-SIRPa de ratón (P84) y un
anticuerpo anti-CD47 (MIAP310) dirigidos a la vía SIRPa/CD47
desde el inicio de la prueba de proliferación a una
concentración de saturación (10 µg/ml). La proliferación se
midió mediante la incorporación de H³-timidina durante las
últimas 12 horas de cultivo.

Resultados: como se muestra en la **Figura 13**, no hay
inhibición del anticuerpo anti-SIRPa o anti-CD47 en la
proliferación de células T de ratón. Este resultado se explica
por el hecho de que los ratones no expresan el gen SIRPg. Por
lo tanto, los ratones pueden usarse como modelo para predecir
los efectos *in vivo* de un anticuerpo específico anti-SIRPa que
no se une a SIRPg. En contraste, los anticuerpos anti-CD47 o
no selectivos anti-SIRPa en la eficacia preclínica *in vivo*, en
particular sobre la inmunidad adaptativa y la generación de
linfocitos T de memoria, no son predictivos de la situación
humana.

Ejemplo 15. Proliferación de células T humanas.

Procedimiento: se aislaron hPBMC de una capa lustrada de

voluntarios sanos. Las células T CD4 o CD8 se seleccionaron mediante selección positiva usando un AutoMACS (Miltenyi) y se sembraron en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las señales proliferativas fueron proporcionadas por microperlas recubiertas con anti-CD3/anti-CD28 (LifeTechnologies) en una perla de 1 T para 1 célula T durante tres días, o células dendríticas alógenas maduras generadas *in vitro* en una célula 5 T durante 1 mDC durante 5 días. Los anticuerpos se agregaron desde el inicio de la prueba de proliferación a una concentración de saturación (5 µg/ml para los anticuerpos anti-CD47 y anti-SIRPa y 2,5 µg/ml para los anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 y el 4- recombinante 1BBL). La proliferación se midió mediante la incorporación de H³-timidina durante las últimas 12 horas de cultivo.

Resultados: como se muestra en la **Figura 14**, los anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 y el 4-1BBL recombinante tienen un efecto de refuerzo en la proliferación de células T humanas, mientras que el anti-CD47 tiene un efecto negativo en la proliferación de células humanas. Células T En particular, el anticuerpo anti-CD47 previene la eficacia inmunoestimuladora de las células T humanas de los agentes agonistas anti-PD-1/PD-L1 o 4-1BB. El anti-SIRPa HEFLB no tiene un efecto significativo sobre la proliferación de células T.

Ejemplo 16. Efectos antitumorales en ratones

Procedimiento: Los ratones se anestesiaron con un cóctel de xilazina/ketamina. Después de una laparotomía, se inyectaron células tumorales Hepa 1.6 a través de la vena porta (2,5x10⁶ células/100 µl) en PBS. El tratamiento se inició 4 días después de la inyección del tumor. El anticuerpo monoclonal anti-4-1BB

agonista (3H3) se inyectó dos veces en d4 y d8 después de la inyección de células Hepa 1.6 (células de hepatocarcinoma, HCC) por vía intraperitoneal en PBS (100 µg/inyección). El anticuerpo monoclonal anti-PDL1 se inyectó dos veces por semana durante 4 semanas por vía intraperitoneal en PBS (200 µg/inyección). El anticuerpo anti-SIRPa antagonista (P84) se inyectó tres veces por semana durante cuatro semanas por vía intraperitoneal en PBS (300 µg/inyección).

La respuesta antitumoral se evaluó en el modelo ortotópico de HCC trece días después de la inoculación del tumor. En este momento, se recogieron el tumor y el bazo para fenotipar las células inmunes que se infiltraron en el tumor o de forma sistémica. Los esplenocitos y las células no parenquimatosas (NPC) del hígado que son las células inmunes infiltrantes se tiñeron con cuatro mezclas diferentes para la adquisición de citometría de flujo.

Resultados: como se muestra en la **Figura 15A**, el anticuerpo anti-SIRPa solo prolonga significativamente la supervivencia en una fracción de ratones (28 %). En combinación con anticuerpos anti-4-1BB o anti-PDL1, el anticuerpo anti-SIRPa permite una tasa de respuesta muy alta de ratones que sobreviven incluso después de la retirada del tratamiento.

Como se muestra en la **Figura 15B**, la combinación de anti-SIRPa con un agente coestimulador (por ejemplo, anti-4-1BB) o inhibidor del punto de control de células T (por ejemplo, anti-PDL1) modifica el microentorno del tumor al disminuir las células inmunológicas reguladoras e inmunosupresoras (Tregs, Mo-MDSC) mientras aumenta la acumulación de células T CD8+ de memoria efectora en combinación con anti-4-1BB. Las Mo-MDSC se

caracterizan por una alta expresión de Ly6C y no Ly6G entre la población CD11b positiva y MHC clase II negativa.

Como se muestra en la **Figura 15C**, la combinación de anti-SIRPa con un agente coestimulador (por ejemplo, anti-4-1BB) o inhibidor de punto de control de células T (por ejemplo, anti-PDL1) modifica la composición celular del microambiente tumoral y en la periferia en el bazo, al disminuir la frecuencia de células B inmaduras e ingenuas al tiempo que aumenta la acumulación de memoria y células plasmablastas. De manera similar, la acumulación de células NK citolíticas (CD27-negativas) es inducida por el tumor y la periferia mediante la combinación de anti-SIRPa con anti-4-1BB o anti-PDL1.

En conjunto, el anti-SIRPa modifica el tumor y la inmunidad periférica en particular las células inmunes adaptativas (células T, células Tregs, células B) e innatas (células MKM, macrófagos, células NK) que contribuyen a la eliminación del tumor y la protección a largo plazo.

Ejemplo 17. Efectos antitumorales en ratones previamente curados

Procedimiento: Ratones curados previamente en el modelo de hepatoma mediante inyección anti-SIRPa+ anti-4-1BB o ratones mutantes SIRPa tratados con anti-4-1BB se volvieron a someter a inyección de células Hepa 1.6 en el bazo ($2,5 \times 10^6$ células/ratón). Los ratones fueron anestesiados con 3 % de isoflurano en el aire. Después de la incisión en el flanco de los ratones y el aislamiento del bazo, se inyectaron células tumorales Hepa 1.6 en el bazo ($2,5 \times 10^6$ células/50 μ l) en PBS. Se inyectaron ratones sin tratamiento previo en paralelo en la misma ruta para comparar el desarrollo de tumores con ratones

reexpuestos.

Resultados: como se muestra en la **Figura 15D**, todos los ratones curados sobrevivieron cuando se volvieron a exponer y, por el contrario, murieron todos los ratones sin tratamiento previo. Este resultado demuestra que las células T de memoria fueron inducidas bajo terapia anti-SIRPa o ausencia de señales de SIRPa (ratones mutantes SIRPa) y aún persisten en el largo plazo en ratones curados.

Ejemplo 18. Efectos antitumorales de esplenocitos de células T o esplenocitos completos recolectados de ratones previamente curados

Procedimiento: Se sometieron a eutanasia ratones curados anti-SIRPa+ anti-4-1BB y se recogió el bazo. Después de la lisis de glóbulos rojos, se extrajeron esplenocitos y se aislaron células T positivas para CD3 de una parte de esplenocitos con un AutoMACS. Después de la anestesia, a los ratones se les inyectaron esplenocitos de células T ($2,5 \times 10^6$ células/100 μ L) o esplenocitos completos (10×10^6 células/100 μ L) o excipiente solo (PBS) por vía intravenosa. Todos los ratones recibieron células Hepa 1.6 a través de la vena porta como se describió anteriormente ($2,5 \times 10^6$ células/100 μ L).

Resultados: como se muestra en la **Figura 15E**, los esplenocitos y linfocitos T aislados recolectados de ratones curados tienen un alto efecto positivo en la supervivencia de los ratones. Estos resultados indican que las células T de memoria están presentes en los esplenocitos de los ratones curados después del tratamiento del hepatoma y son responsables de la memoria inmune adaptativa a largo plazo.

Ejemplo 19. Efectos antitumorales en ratones previamente curados

Procedimiento: los ratones previamente curados en el modelo de hepatoma mediante inyección anti-SIRPa+ anti-PDL-1 se volvieron a exponer mediante inyección de células Hepa 1.6 en el bazo ($2,5 \times 10^6$ células/ratón). Los ratones fueron anestesiados con 3 % de isoflurano en el aire. Después de la incisión en el flanco de los ratones y el aislamiento del bazo, se inyectaron células tumorales Hepa 1.6 en el bazo ($2,5 \times 10^6$ células/50 μ l) en PBS. Se inyectaron ratones sin tratamiento previo en paralelo en la misma ruta para comparar el desarrollo de tumores con ratones reexpuestos.

Resultados: como se muestra en la **Figura 16**, todos los ratones curados sobrevivieron cuando se volvieron a exponer y, por el contrario, murieron todos los ratones sin tratamiento previo. Este resultado sugiere que las células T de memoria todavía están presentes en ratones curados. Este resultado demuestra que las células T de memoria fueron inducidas bajo terapia anti-SIRPa y aún persisten a largo plazo en ratones curados.

Ejemplo 20. Efectos del crecimiento de un tumor en un modelo de carcinoma mamario

Procedimiento: Los ratones se anestesiaron con 3 % de isoflurano en el aire. Los ratones se afeitaron en el abdomen y se inyectaron células 4T1 en la glándula mamaria con una jeringa de insulina (30 medidores) en 50 μ l de PBS. El anticuerpo anti-SIRPa antagonista (P84) o un anticuerpo de control se inyectó tres veces por semana durante cuatro semanas por vía intraperitoneal en PBS (200 μ g/inyección).

Resultados: Como se muestra en la **Figura 17**, el anticuerpo anti-SIRPa reduce significativamente ($p<0,01$) el crecimiento del tumor en el modelo de carcinoma mamario en comparación con un anticuerpo de control.

La **Figura 18** muestra el análisis de células inmunes dos semanas después de la inoculación. El anti-SIRPa tiene un efecto positivo en las células mieloides y no mieloides (células T y NK) tanto en el tumor como en la periferia (bazo) con una disminución dramática de las Treg y la acumulación de células T de memoria.

Ejemplo 21. Efectos de los anticuerpos contra SIRPa sobre la concentración de hemoglobina y sobre el hematocrito

Procedimiento: Anti-SIRPa (clon P84), anti-CD47 (clon MIAP410) y control de isotipo irrelevante se administraron por vía intraperitoneal el día 0 y el día 2 a 12 mg/kg en ratones C57Bl/6. Las muestras de sangre se recogieron el día 0 y el día 3 en tubos que contenían EDTA y el recuento sanguíneo se realizó con un analizador de hematología XS-800i (Sysmex). El nivel de hemoglobina (izquierda) y el porcentaje de hematocrito (derecha) se evaluaron en el día 3.

Resultados: como se muestra en la **Figura 19**, el anticuerpo anti-SIRPa no tiene efecto tóxico sobre la concentración de hemoglobina y sobre el hematocrito. Por el contrario, el anticuerpo anti-CD47 induce una disminución de la concentración de hemoglobina y del hematocrito de acuerdo con la anemia observada durante la fase 1 en el hombre.

Ejemplo 22. Agregación plaquetaria

Procedimiento: se extrajo sangre de donantes sanos y voluntarios en tubos de recolección de Vacuette (Greiner Bio-One) tamponados con citrato de sodio. El plasma rico en plaquetas (PRP) y el plasma pobre en plaquetas (PPP) se obtuvieron por centrifugación durante 10 minutos a 200 g y 15 minutos a 3.500 g, respectivamente. El PRP de trabajo se ajustó a 3×10^8 plaquetas. L^{-1} . *Ensayos de inhibición:* los mAb se incubaron previamente con PRP para una concentración final de 40 o 50 $\mu g.mL^{-1}$ anticuerpos de prueba. Después de 3 minutos sin agitación, se inició la agregación plaquetaria con la adición de ADP 5 μM . La agregación se determinó midiendo la transmisión de luz a través de la muestra a 37 °C con agitación continua usando un agregómetro óptico estándar (TA-8V Thrombo-Aggregometer, SD Innovation SAS, Frouard, Francia). La transmisión de PPP se fijó en 100 %. La agregación se registró con agitación durante un total de 5 minutos. *Ensayos de inducción:* la agregación plaquetaria se inició directamente mediante la adición de mAb (50 $\mu g.mL^{-1}$). La agregación se registró con agitación por un total de máximo 10 minutos.

Resultados: Como se muestra en la **Figura 20**, a diferencia de los anticuerpos anti-CD47, los anticuerpos anti-SIRPa no se unen a los glóbulos rojos o plaquetas humanos. En consecuencia, el anti-CD47 induce la agregación de plaquetas humanas *in vitro* mientras que los anticuerpos anti-SIRPa no lo hacen. De manera similar, los anticuerpos anti-SIRPa no perturban la agregación reversible de plaquetas humanas inducidas por ADP, mientras que la anti-integrina alfa 2b la revoca completamente.

Ejemplo 23. Proliferación de células T alogénicas por

**células CD14+ que bloquean SIRPa de una ascitis ovárica de
cáncer**

Procedimiento: Se aislaron células T CD4 alogénicas mediante selección positiva usando un AutoMACS (Miltenyi) de hPBMC de una capa leucocitaria de un voluntario sano. CD4 se colocaron en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células CD14+ se aislaron por el mismo procedimiento de la ascitis de un paciente ovárico con cáncer. Las células CD14+ se colocaron en placas con las células T CD4 alogénicas en una proporción de 1:1 durante 5 días. En algunas condiciones, se agregaron células dendríticas derivadas de monocitos alogénicos (moDC) maduras con LPS humano en una proporción de 1:5 para estimular las células T y se analizó la acción inmunosupresora de diferente proporción de MDSC CD14+ purificada de la ascitis. Se agregaron anticuerpos dirigidos a la vía SIRPa/CD47 desde el inicio de la prueba de proliferación a una concentración de saturación (10 µg/ml). La proliferación se midió mediante la incorporación de H³-timidina durante las últimas 12 horas de cultivo.

Resultados: como se muestra en las **Figuras 21A y 21B**, las células mieloides humanas frescas y congeladas (TAM) purificadas a partir de la ascitis por cáncer de ovario son linfocitos T humanos alogénicos hipoestimulantes. En contraste con los anticuerpos anti-CD47, los anticuerpos anti-SIRPa modifican las propiedades de las células mieloides permitiendo la activación y proliferación de las células T humanas.

Como se muestra en la **Figura 21C**, las células mieloides humanas (MDSC) purificadas a partir de la ascitis por cáncer de ovario pueden suprimir la proliferación de células T humanas

inducida por moDC alogénica en una proporción de 1:1 y 2:1 de mieloides a células T. En contraste con los anticuerpos anti-CD47, los anticuerpos anti-SIRPa no potencian la inmunosupresión inducida por MDSC humana.

5

10

15

20

25

30

1. Un anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se unen específicamente al menos a un péptido de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 dentro de SIRPa humana,

en particular, que se unen específicamente al péptido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 dentro de SIRPa humana y al menos a otro péptido de secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 dentro de SIRPa humana; y/o

que se unen específicamente a un epítoto conformacional que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72 dentro de SIRPa humana.

2. El anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, que se unen específicamente a los péptidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 dentro de SIRPa humana; y/o

que se unen específicamente a un epítoto conformacional que consiste en el péptido de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 73 y el péptido de la secuencia de aminoácidos SIR dentro de SIRPa humana.

3. El anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión

a antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y/o

5 b) un dominio variable de cadena ligera que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3,

en el que:

- HCDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14,

10 - HCDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16,

- HCDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20,

15 - LCDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21,

- LCDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22, y

20 - LCDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 23.

4. Un anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, que comprende:

25 a) un dominio variable de cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y/o

b) un dominio variable de cadena ligera que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3,

en donde:

30 - HCDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14,

- HCDR2 comprende o consiste en la secuencia de

aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16,

- HCDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20,

5 - LCDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 21,

- LCDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 y

10 - LCDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 23.

5. El anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 a 4, que es un anticuerpo antagonista anti-SIRPa, que inhibe la unión de CD47 humana a SIRPa humana.

6. El anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión
20 a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que no se une específicamente a SIRPg humana.

7. El anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión
25 a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que no se une específicamente a células T humanas, en particular a células T CD3+.

30 8. El anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 7, que no inhibe la proliferación de células T humanas.

9. El anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que no inhibe la unión de CD47 humana a SIRP γ humana.

10. El anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30, y/o

- un dominio variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33, en particular, que comprende:

- un dominio variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 33, y

- un dominio variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30, en particular SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, y más particularmente SEQ ID NO: 30.

11. El anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende:

- 5 - un dominio variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 24, y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 31,
- 10 o
- un dominio variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 25, y
- 15 - un dominio variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 32,
- o
- un dominio variable de cadena pesada que comprende o
- 20 consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 25, y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 33,
- 25 o
- un dominio variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 26, y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende o
- 30 consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 32,
- o

- un dominio variable de cadena pesada que comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:
26, y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende o
5 consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:
33,
o
- un dominio variable de cadena pesada que comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:
10 27, y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:
32,
o
- un dominio variable de cadena pesada que comprende o
15 consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:
27, y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende o
consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:
20 33,
o
- un dominio variable de cadena pesada que comprende o
consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID
NO: 28, y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende o
25 consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:
32,
o
- un dominio variable de cadena pesada que comprende o
30 consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID
NO: 28, y
- un dominio variable de cadena ligera que comprende o

consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

33,

o

- un dominio variable de cadena pesada que comprende o

5 consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

29, y

- un dominio variable de cadena ligera que comprende o

consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

32,

10 o

- un dominio variable de cadena pesada que comprende o

consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

29, y

- un dominio variable de cadena ligera que comprende o

15 consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

33,

o

- un dominio variable de cadena pesada que comprende o

consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID

20 NO: 30, y

- un dominio variable de cadena ligera que comprende o

consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

32,

o

25 - un dominio variable de cadena pesada que comprende o

consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID

NO: 30, y

- un dominio variable de cadena ligera que comprende o

consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID

30 NO: 33.

12. El anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de

unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado, en particular en donde el dominio constante de cadena ligera de anticuerpo se deriva de un dominio constante de cadena ligera kappa humana, más particularmente en donde el dominio constante de cadena ligera consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 35, y en donde el dominio constante de cadena pesada del anticuerpo se deriva de un dominio constante de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, en particular de un dominio constante de cadena pesada de IgG4 humana, más particularmente en donde el dominio constante de cadena pesada de anticuerpo consiste en la secuencia con SEQ ID NO: 34.

15

13. El anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o

20

un anticuerpo antagonista anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, que inhibe la unión de CD47 humana a SIRPa humana, y que no se une específicamente a SIRPg humana, y/o que no se une específicamente a células T humanas, y/o que no inhibe la proliferación de células T humanas, y/o que no inhibe la unión de CD47 humana a SIRPg humana,

25

para su uso como un medicamento.

30

14. El anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o

un anticuerpo antagonista anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno, que inhibe la unión de CD47 humana a SIRPa humana, y que no se une específicamente a SIRPg humana, y/o

5 que no se une específicamente a células T humanas, y/o que no inhibe la proliferación de células T humanas, y/o que no inhibe la unión de CD47 humana a SIRPg humana,

para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en un cáncer

10 (en particular cáncer inflamatorio y cáncer con células mieloides infiltradas, particularmente con células MDSC y/o TAM infiltradas), una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria crónica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad neurológica, una lesión cerebral, una lesión

15 nerviosa, una policitemia, una hemocromatosis, un traumatismo, un shock séptico, una enfermedad infecciosa crónica (en particular Pseudomonas y CMV), fibrosis, aterosclerosis, obesidad, diabetes tipo II y una disfunción por trasplante, o para su uso en vacunación.

20

15. El anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para su uso de acuerdo con la

25 reivindicación 14, en donde dichos anticuerpo anti-SIRPa humana o fragmento de unión a antígeno del mismo o mimético de anticuerpo de unión a antígeno se administran a un paciente que presenta un tumor positivo a SIRPa.

30

16. Una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a

antígeno como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 17. Un producto de combinación que comprende:

 - al menos un anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y

10 - al menos un segundo agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en agentes quimioterapéuticos, agentes de radioterapia, agentes inmunoterapéuticos, agentes de terapia celular, antibióticos y probióticos; en particular, agentes inmunoterapéuticos seleccionados del grupo que
15 consiste en un bloqueador del punto de control o un activador de células inmunológicas adaptativas, particularmente seleccionado del grupo que consiste en anti-PDL1, anti-PD1, anti-CTLA4, anti-CD137, anti-CD2, anti-CD28, anti-CD40, anti-HVEM, anti-BTLA, anti-CD160, anti-TIGIT, anti-TIM-1/3, anti-
20 LAG-3, anti-2B4 y anti-OX40, agonista anti-CD40, CD40-L, agonistas de TLR, anti-ICOS, ICOS-L y agonistas de receptores de células B,

 para su uso simultáneo, separado o secuencial como un medicamento.

25

 18. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

30

 19. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 18.

20. Una célula huésped aislada que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 18 y/o un vector de acuerdo con la reivindicación 19.

5

21. Un polipéptido, particularmente un antígeno, que comprende o consiste en la secuencia del epítipo de SIRPa humana que consiste en SEQ ID NO: 3,

10 en particular un antígeno que comprende o consiste en la secuencia del epítipo de SIRPa humana que consiste en SEQ ID NO: 3 y al menos una secuencia del epítipo de SIRPa humana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, más particularmente un antígeno que comprende o consiste en las
15 secuencias de epítopos de SIRPa humana que consisten en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6,

dicho polipéptido consiste en una secuencia de hasta 300 aminoácidos.

20

22. Un procedimiento para fabricar un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende inmunizar a un animal no humano, en particular a un mamífero no humano, contra al menos un antígeno como se define
25 en la reivindicación 21 y/o contra al menos un antígeno que comprende o consiste en al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73 y el péptido de la secuencia de aminoácidos SIR, consistiendo dicho antígeno en una secuencia de hasta 300
30 aminoácidos y, en particular, recolectar el suero resultante de dicho animal no humano inmunizado para obtener anticuerpos dirigidos contra dicho antígeno.

23. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para determinar células SIRPa positivas en un sujeto a partir de una muestra biológica previamente obtenida de dicho sujeto, que comprende:

- 5 i) determinar *in vitro* la expresión y/o el nivel de expresión de SIRPa en una muestra biológica obtenida previamente de dicho sujeto usando el anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se define en
10 una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

24. Un procedimiento de diagnóstico *in vitro* o *ex vivo*, en particular un procedimiento de diagnóstico adecuado para su uso en medicina personalizada, más particularmente en un
15 diagnóstico complementario, en donde un anticuerpo anti-SIRPa o un fragmento de unión a antígeno o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 se usan para la detección de células SIRPa+ en una muestra obtenida previamente de un sujeto y
20 opcionalmente para la cuantificación de la expresión de SIRPa.

25. Uso de un anticuerpo anti-SIRPa o de un fragmento de unión a antígeno del mismo o de un mimético de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14,
25 en la fabricación de un medicamento adecuado para su uso en una prueba de diagnóstico, en particular para su uso en medicina personalizada, o en una prueba de diagnóstico complementaria.

30 26. Uso *in vitro* o *ex vivo* de al menos un anticuerpo anti-SIRPa humana o del fragmento de unión a antígeno del mismo o del mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se define

en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en un procedimiento en el que se usa SIRPa como un biomarcador que es predictivo para la respuesta a un tratamiento en un sujeto, en particular en un sujeto con cáncer.

5

27. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para predecir la respuesta de un sujeto con cáncer a un tratamiento, en particular con un anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende:

- determinar el nivel de expresión de SIRPa en una muestra de tumor obtenida previamente de un sujeto, en particular con un anticuerpo anti-SIRPa humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y

- comparar el nivel de expresión de SIRPa con un valor representativo de un nivel de expresión de SIRPa en una población de sujetos que no responden,

en donde un nivel de expresión más alto de SIRPa en la muestra de tumor del sujeto es indicativo para un paciente que responderá al tratamiento.

25

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos anti-SIRPa capaces de antagonizar específicamente la
5 interacción entre SIRPa y CD47, sin afectar la interacción entre SIRPg y CD47, y sus usos.

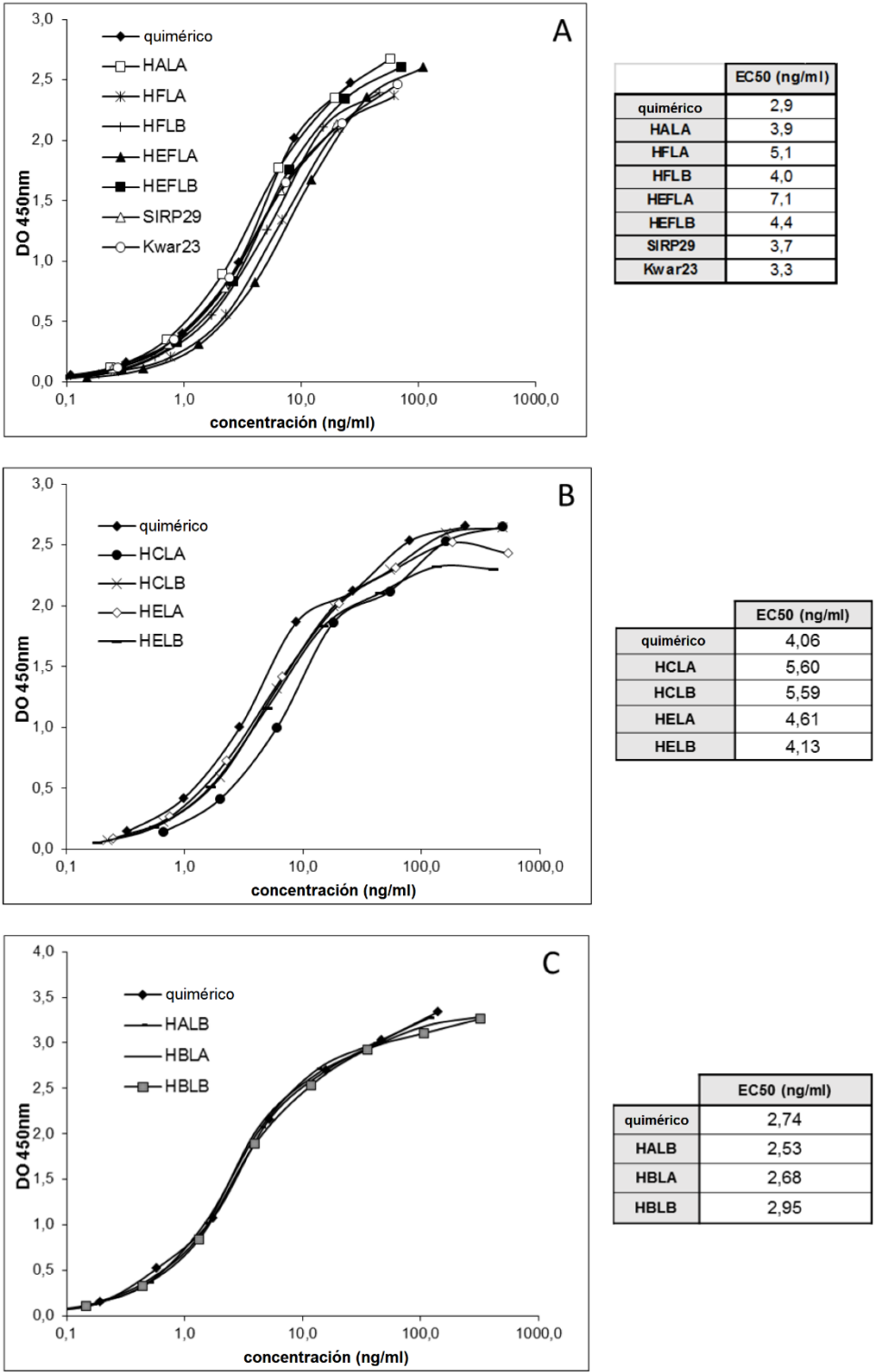


FIGURA 1 (inicio)

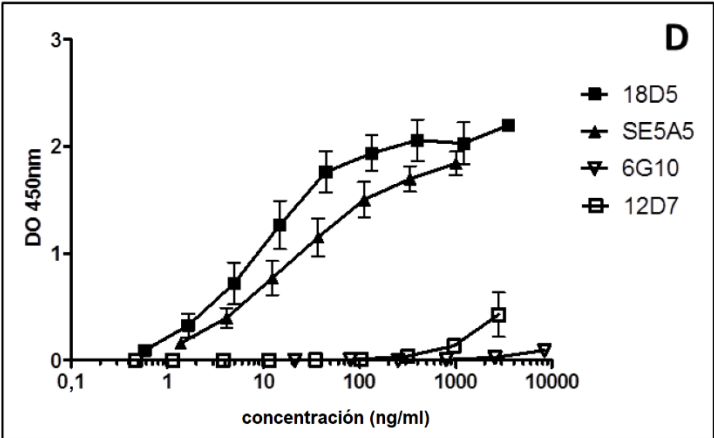
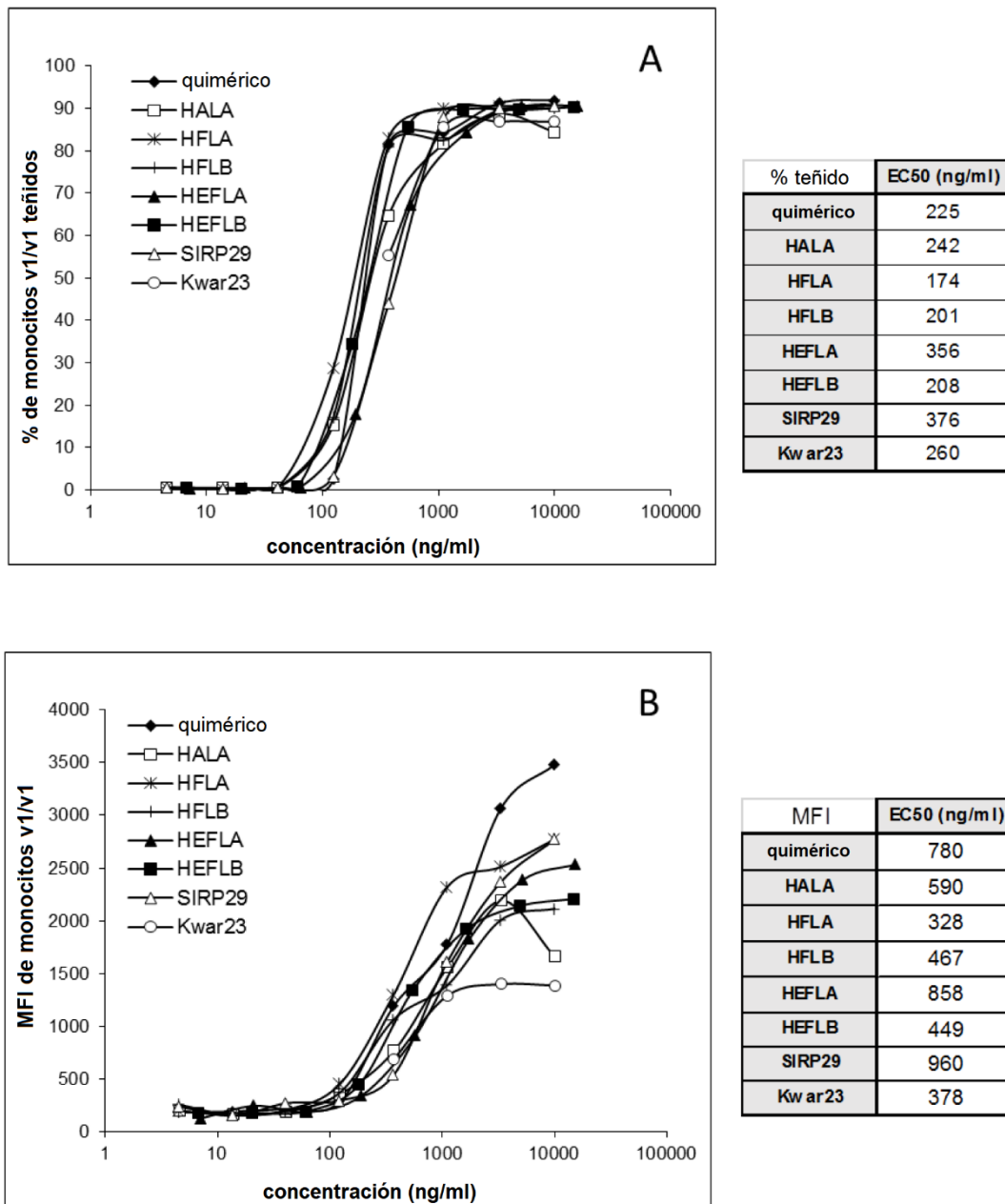


FIGURA 1 (fin)

	Asociación (ka) (1/Ms)	Disociación (kd) (1/s)	Afinidad (KD) (M)
ratón 18D5	6,23e4	1,20e-5	1,93e-10
quimérico	1,49e5	5,14e-5	3,44e-10
HFLA	8,57e5	1,86e-4	2,17e-10
HFLB	7,91e5	2,49e-4	3,15e-10
HEFLA	5,59e5	1,48e-4	2,64e-10
HEFLB	6,54e5	1,89e-4	2,89e-10
SIRP29	4,15e4	1,01e-5	2,43e-10
Kwar23	2,44e5	8,95e-5	3,67e-10
SE7C2	5,98e3	0,01	1,67e-6
SE5A5	2,45e4	9,49e-4	3,87e-8

FIGURA 2



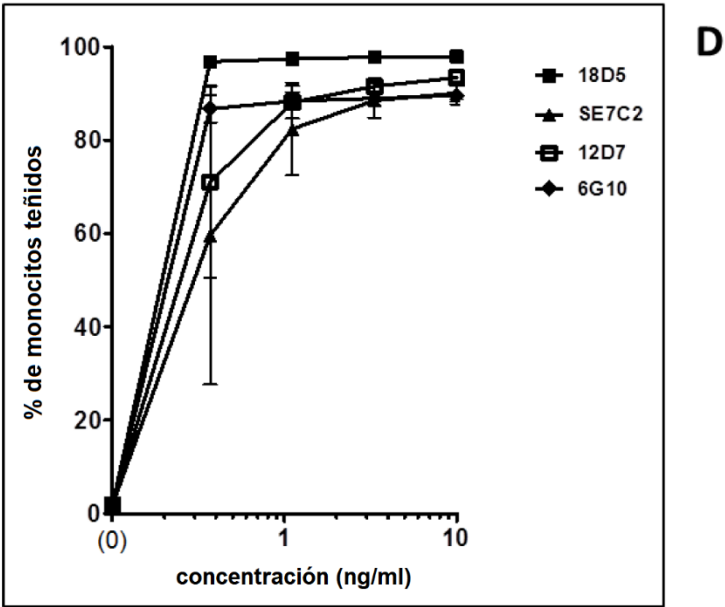
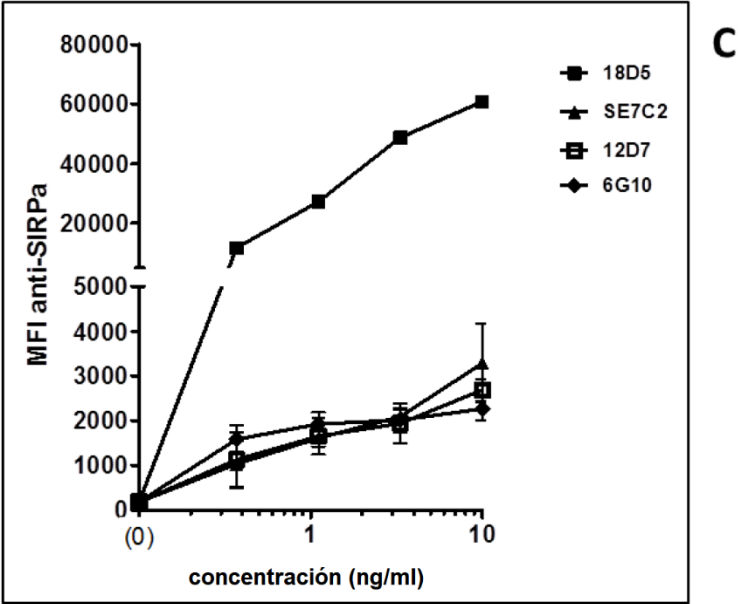


FIGURA 3 (mitad)

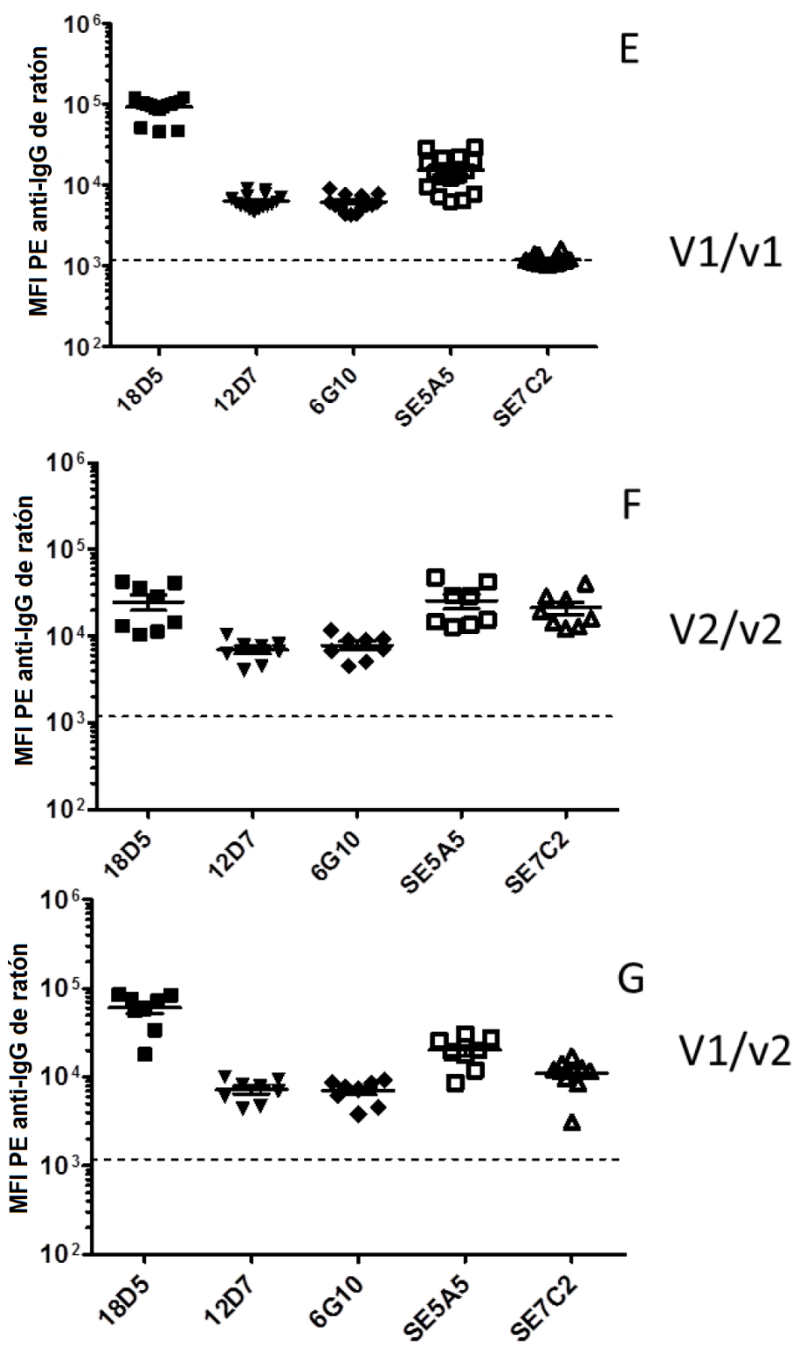
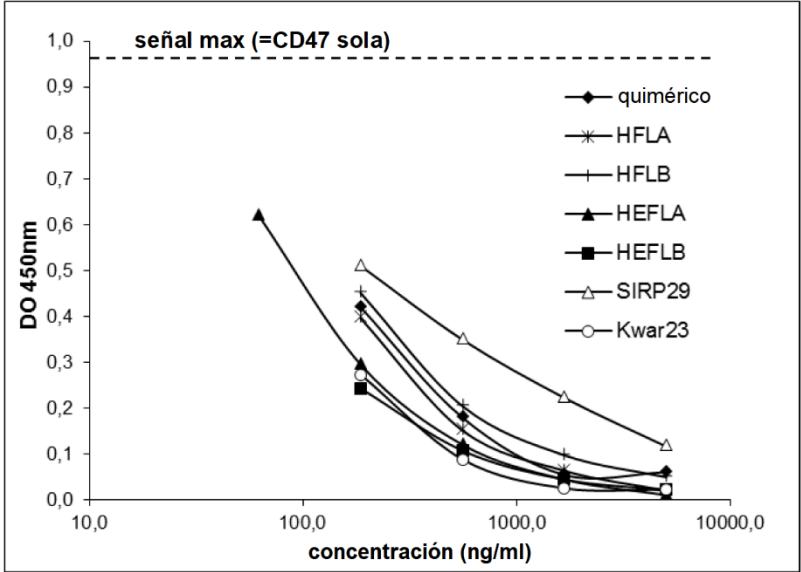


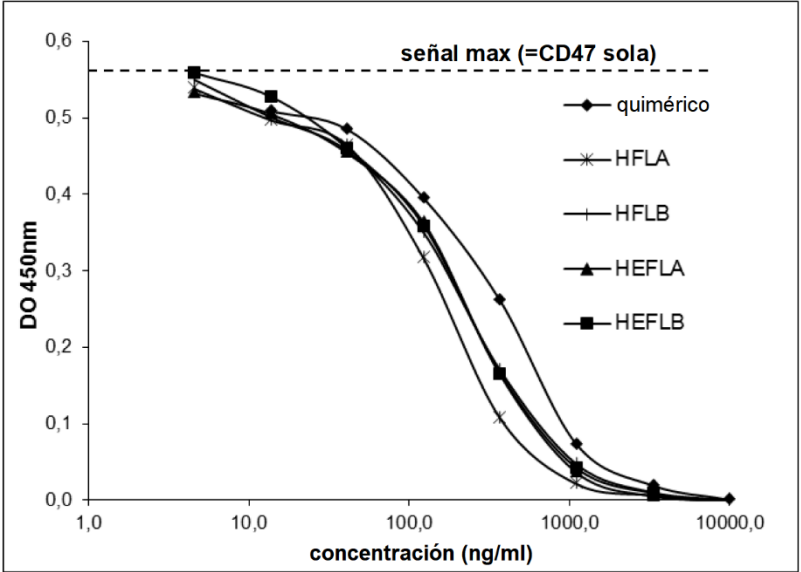
FIGURA 3 (fin)

A

Primer experimento



Segundo experimento



	IC50 (ng/ml)
quimérico	303,8
HFLA	146,2
HFLB	182,7
HEFLA	190,6
HEFLB	186,3

FIGURA 4 (inicio)

B

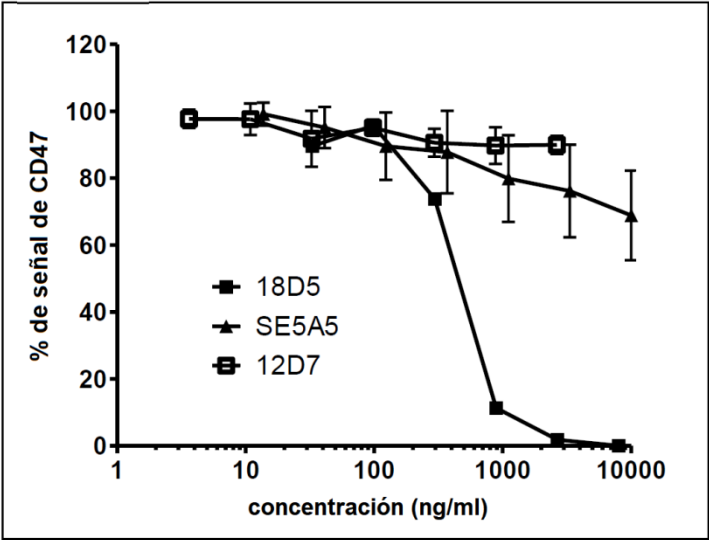
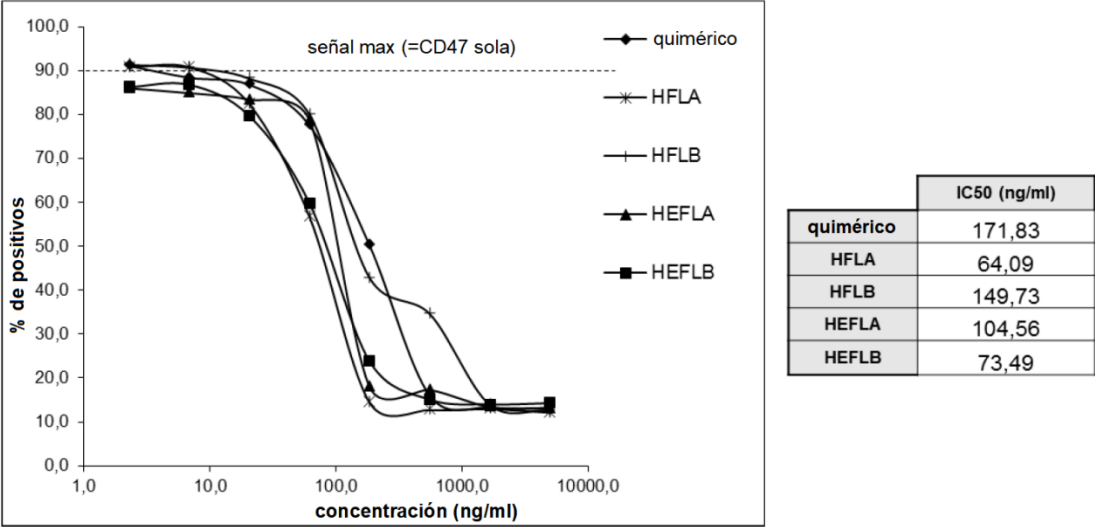


FIGURA 4 (fin)

A



B

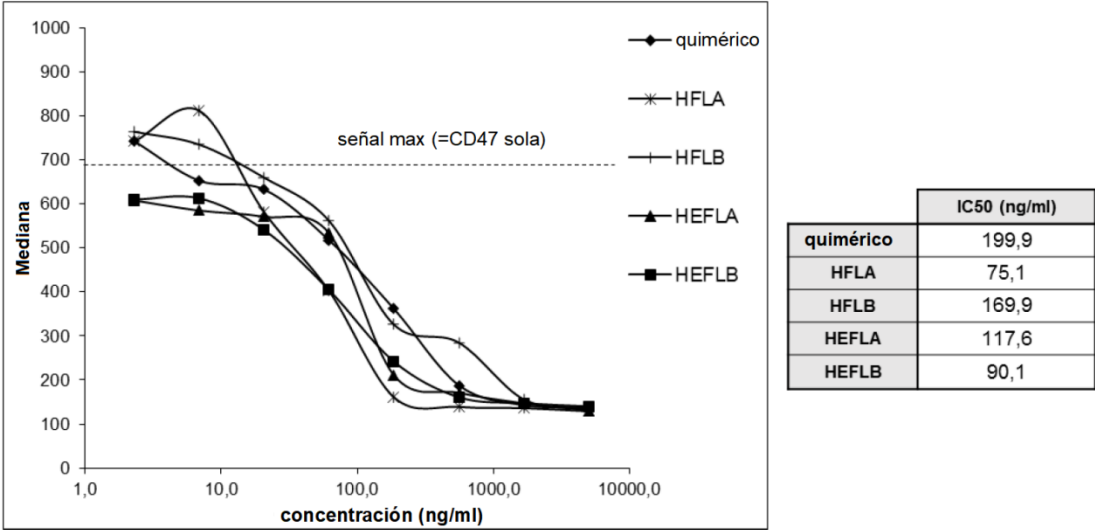


FIGURA 5 (inicio)

C

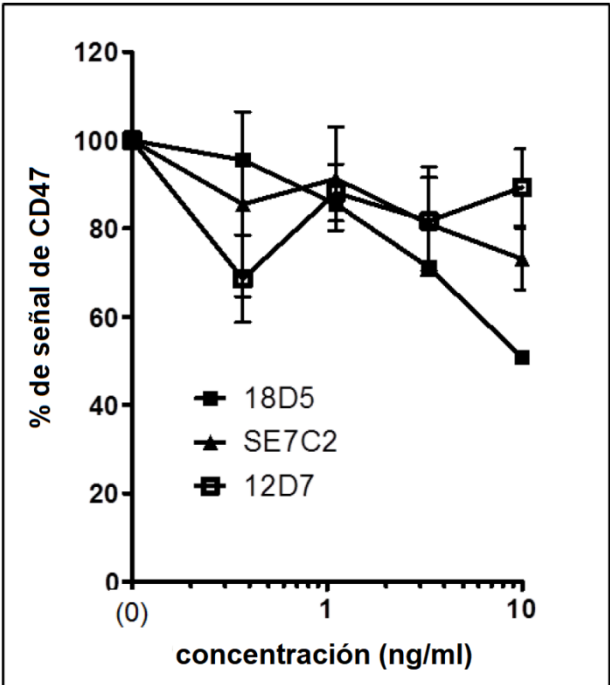


FIGURA 5 (fin)

A	Asociación	Disociación	Afinidad
	(ka) (1/Ms)	(kd) (1/s)	(KD) (M)
ratón 18D5	1,58e4	1,76e-3	1,11e-7
ratón 18D5 con SP-D	3,797e5	1,088e-2	2,865e-8

B	Asociación	Disociación	Afinidad
	(ka) (1/Ms)	(kd) (1/s)	(KD) (M)
SP-D	2,465e3	1,078e-2	4,372e-6
SPD con ratón 18D5	3,272e3	2,405e-3	7,35e-7

FIGURA 6

A

	Asociación (ka) (1/Ms)	Disociación (kd) (1/s)	Afinidad (KD) (M)
Quimérico	8,837e4	1,385e-3	1,568e-8
HALA	1,328e5	8,504e-4	6,403e-9
HFLA	7,447e4	1,919e-3	2,576e-8
HFLB	6,694e4	1,738e-3	2,596e-8
HEFLA	9,827e4	1,221e-3	1,243e-8
HEFLB	1,939e4	1,711e-3	8,69e-8
SIRP29	1,078e5	8,114e-4	7,531e-9
kwar23	2,863e5	7,935e-4	2,772e-9

B

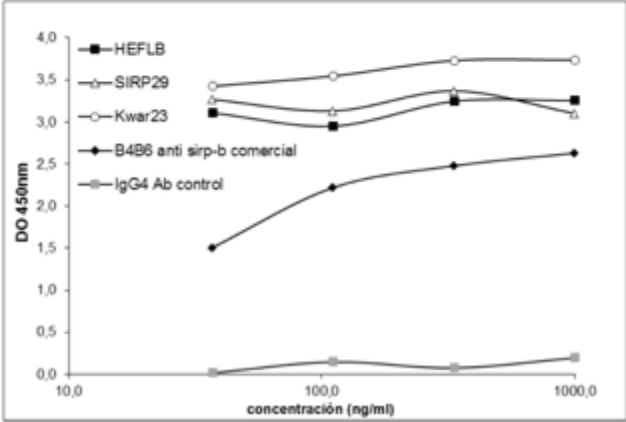


FIGURA 7

A

	Asociación (ka) (1/Ms)	Disociación (kd) (1/s)	Afinidad (KD) (M)
Quimérico	4,93e4	3,194e-3	6,479e-8
HALA	1,539e5	7,093e-3	4,609e-8
HFLA	2,477e5	1,18e-2	4,764e-8
HFLB	1,191e5	1,234e-2	1,036e-7
HEFLA	2,173e5	1,14e-2	5,244e-8
HEFLB	1,92e5	1,193e-2	6,215e-8
SIRP29	1,36e5	7,2e-4	5,296e-9
kwar23	3,57e5	7,648e-4	2,142e-9

B

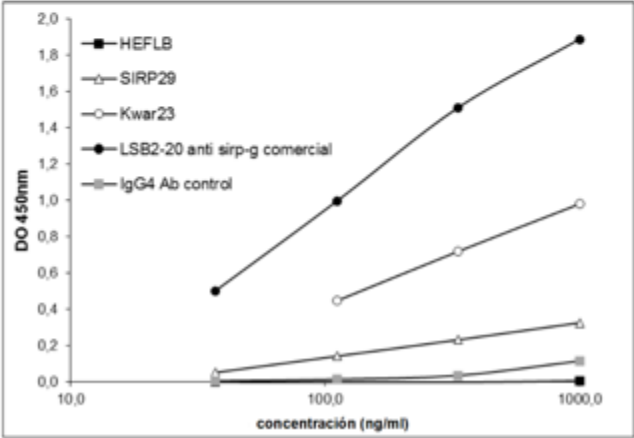


FIGURA 8

	Asociación (ka) (1/Ms)	Disociación (kd) (1/s)	Afinidad (KD) (M)
CD47 sola	2,193e4	1,309e-2	5,969e-7
HEFLB +CD47	5,372e4	5,334e-2	9,928e-7
SIRP29 +CD47	2,118e4	5,525e-2	2,572e-6
Kwar23 +CD47	4,369e2	1,259e-1	2,88e-4

FIGURA 9

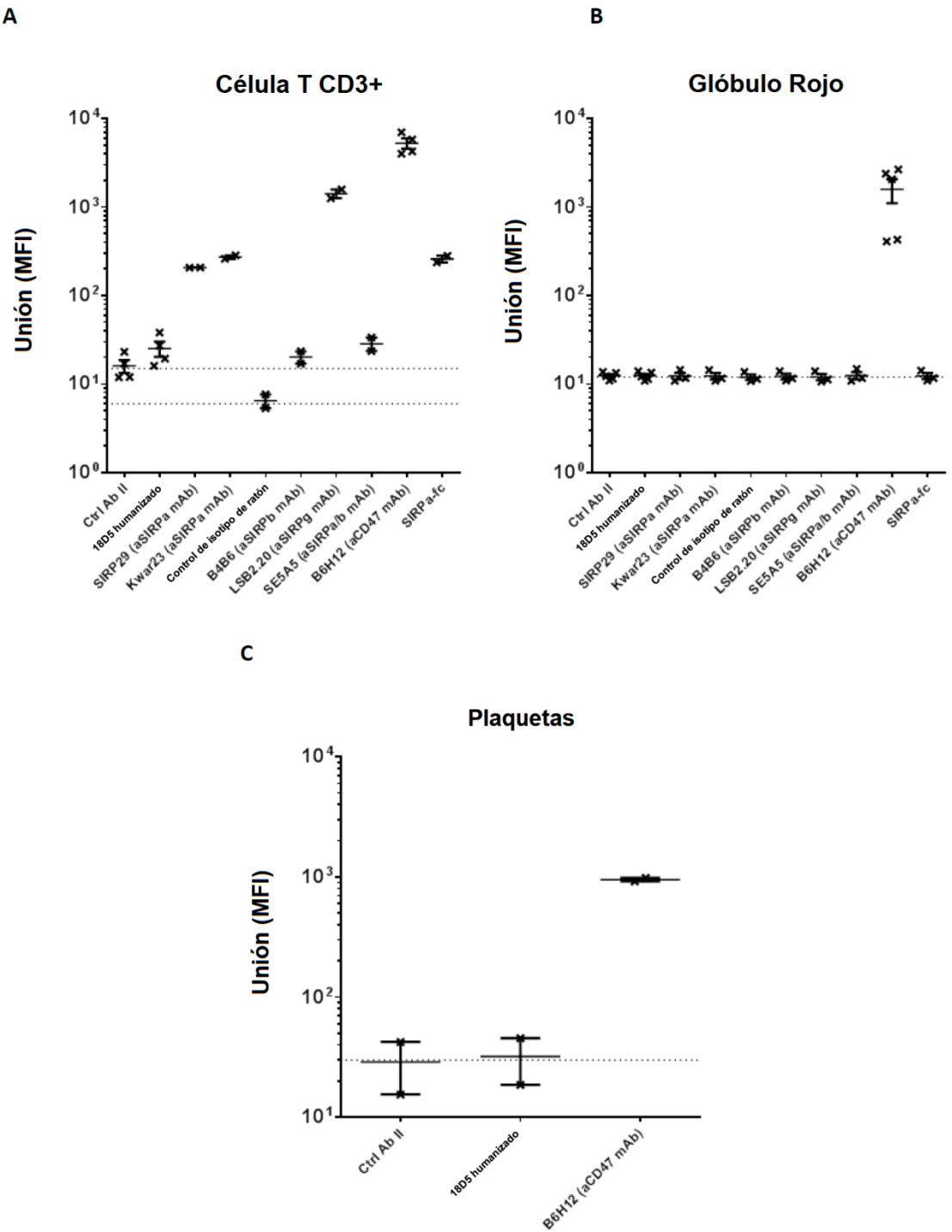


FIGURA 10

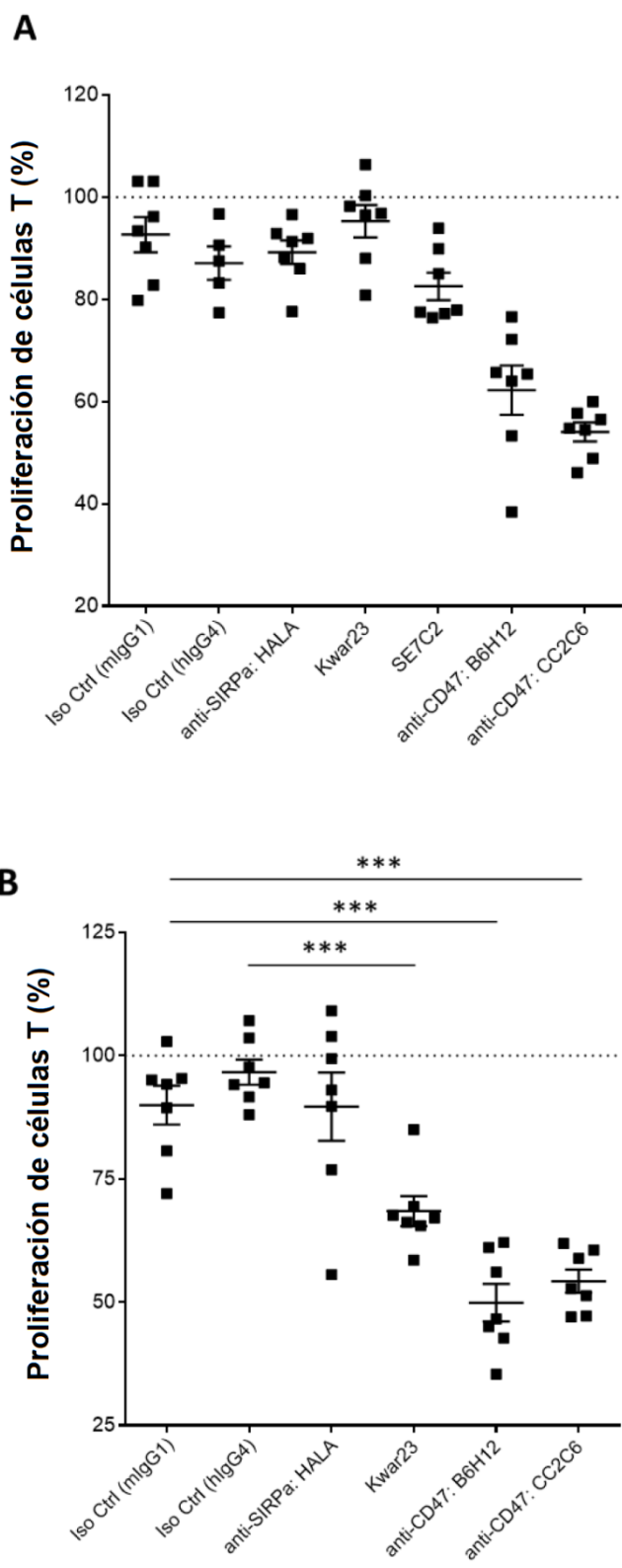


FIGURA 12 (inicio)

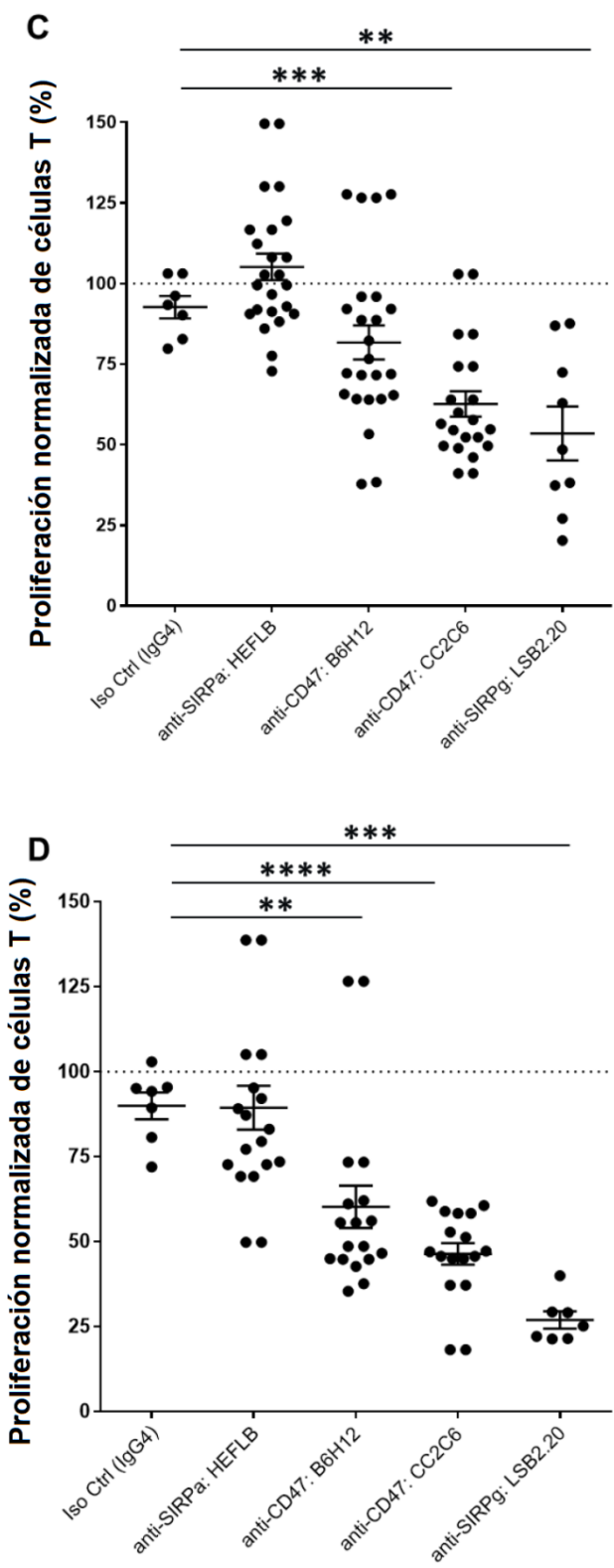


FIGURA 12 (mitad)

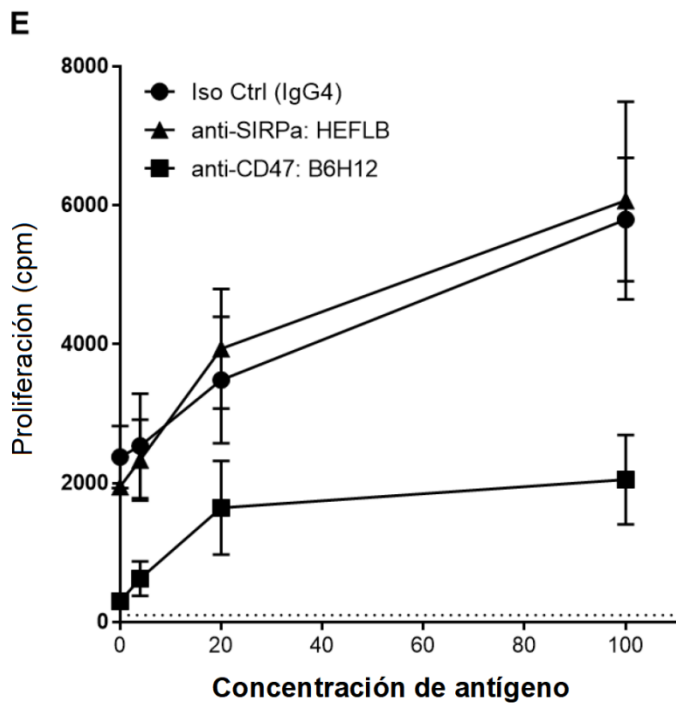


FIGURA 12 (fin)

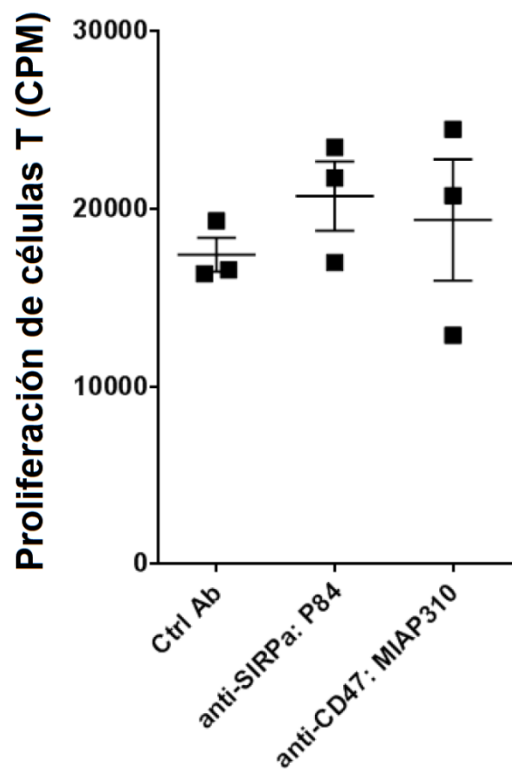


FIGURA 13

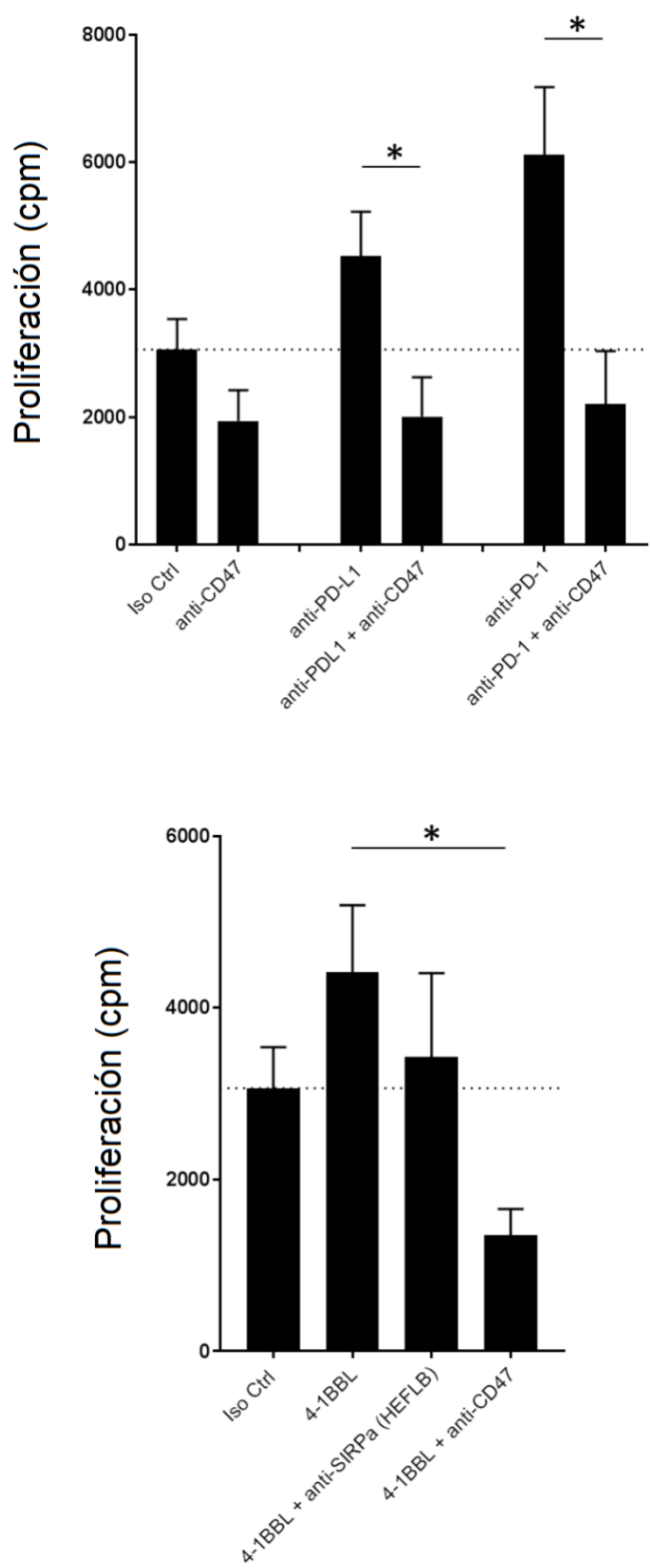


FIGURA 14

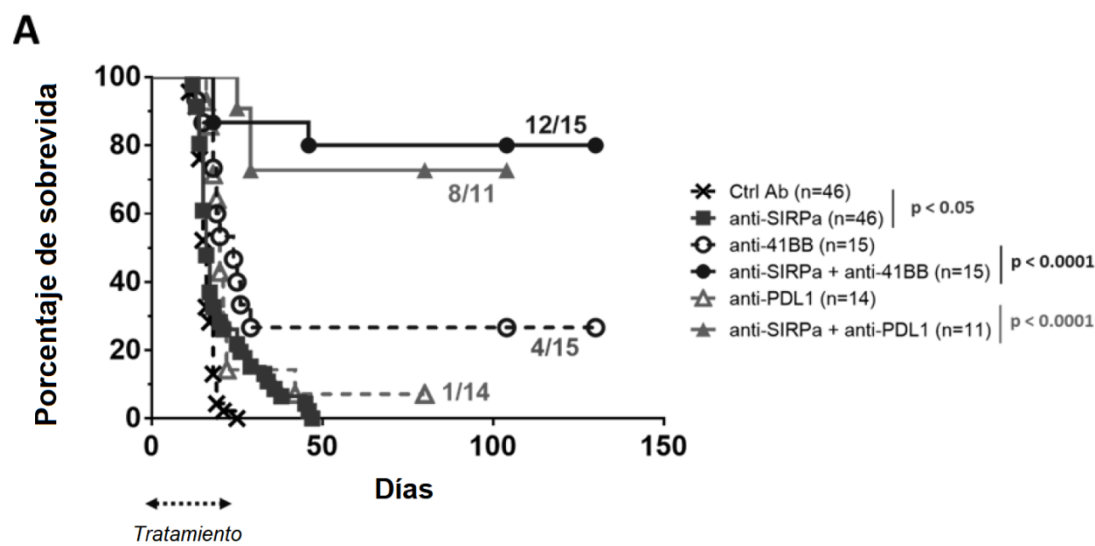
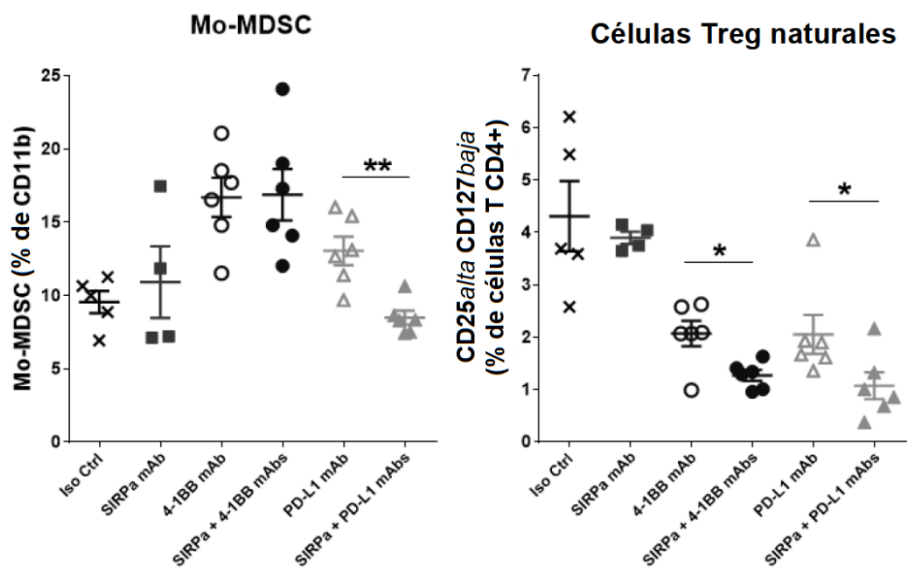


FIGURA 15 (inicio)

B Células reguladoras reducidas



Células T efectoras aumentadas

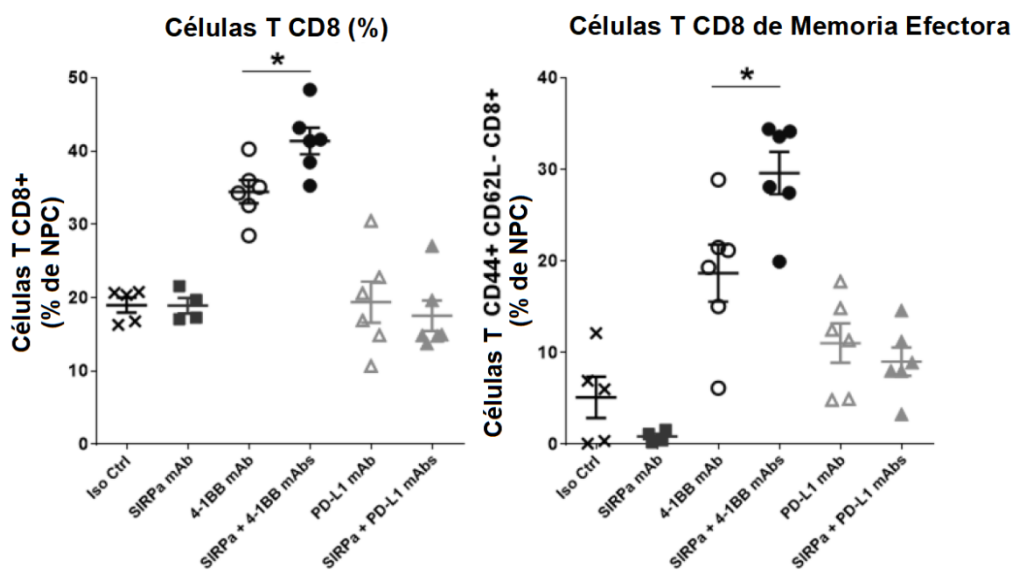


FIGURA 15 (mitad)

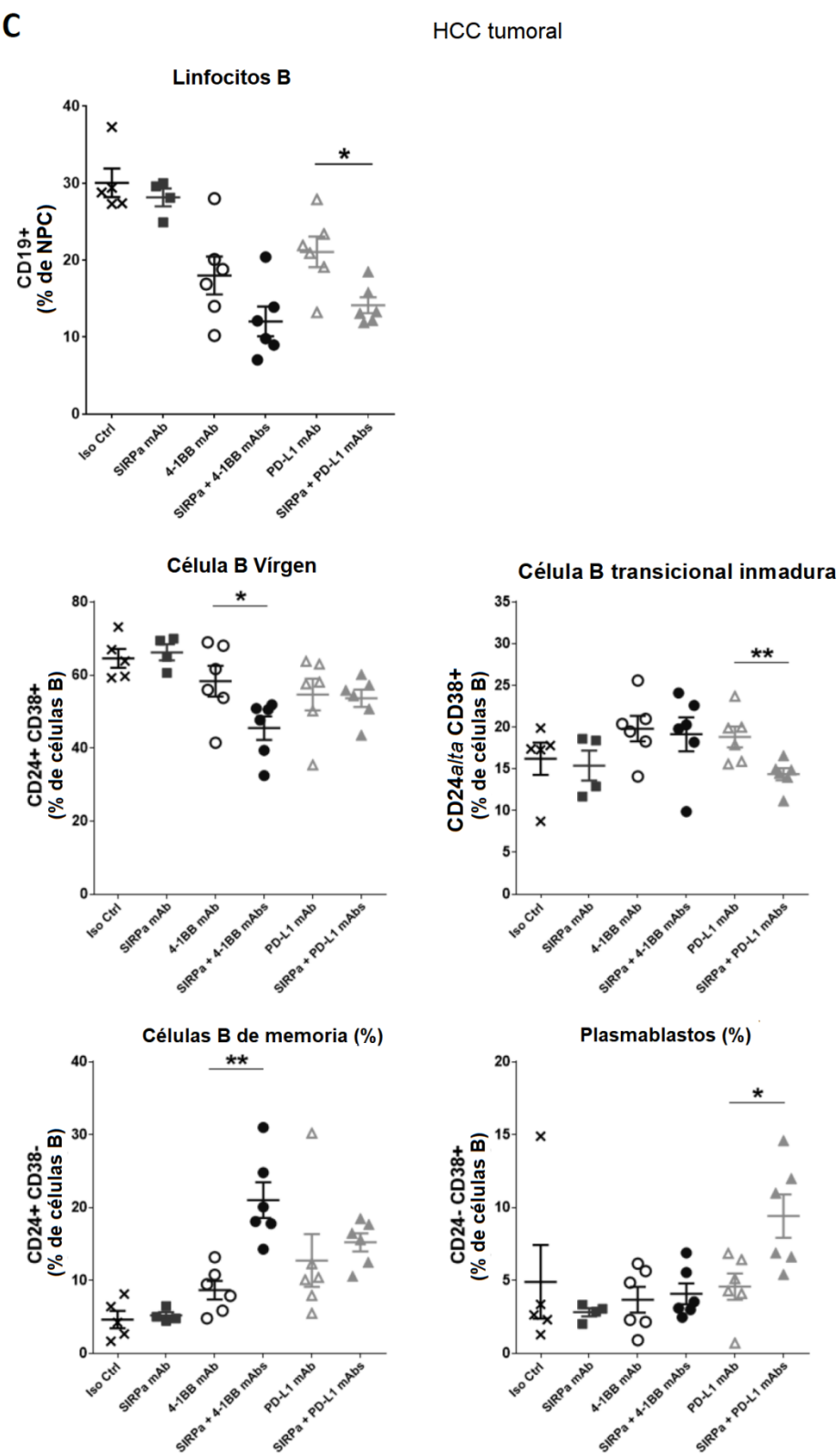


FIGURA 15 (mitad)

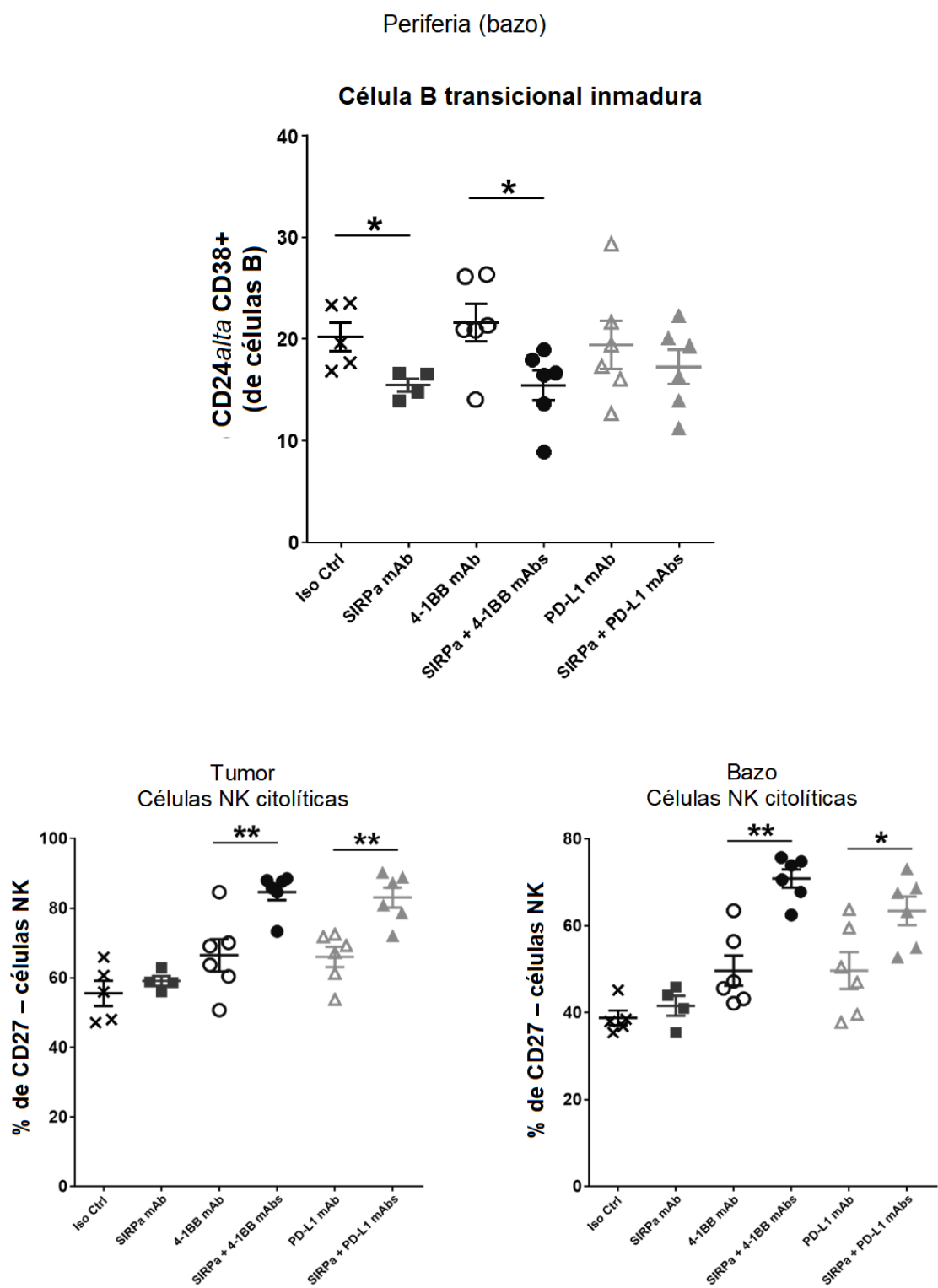


FIGURA 15 (mitad)

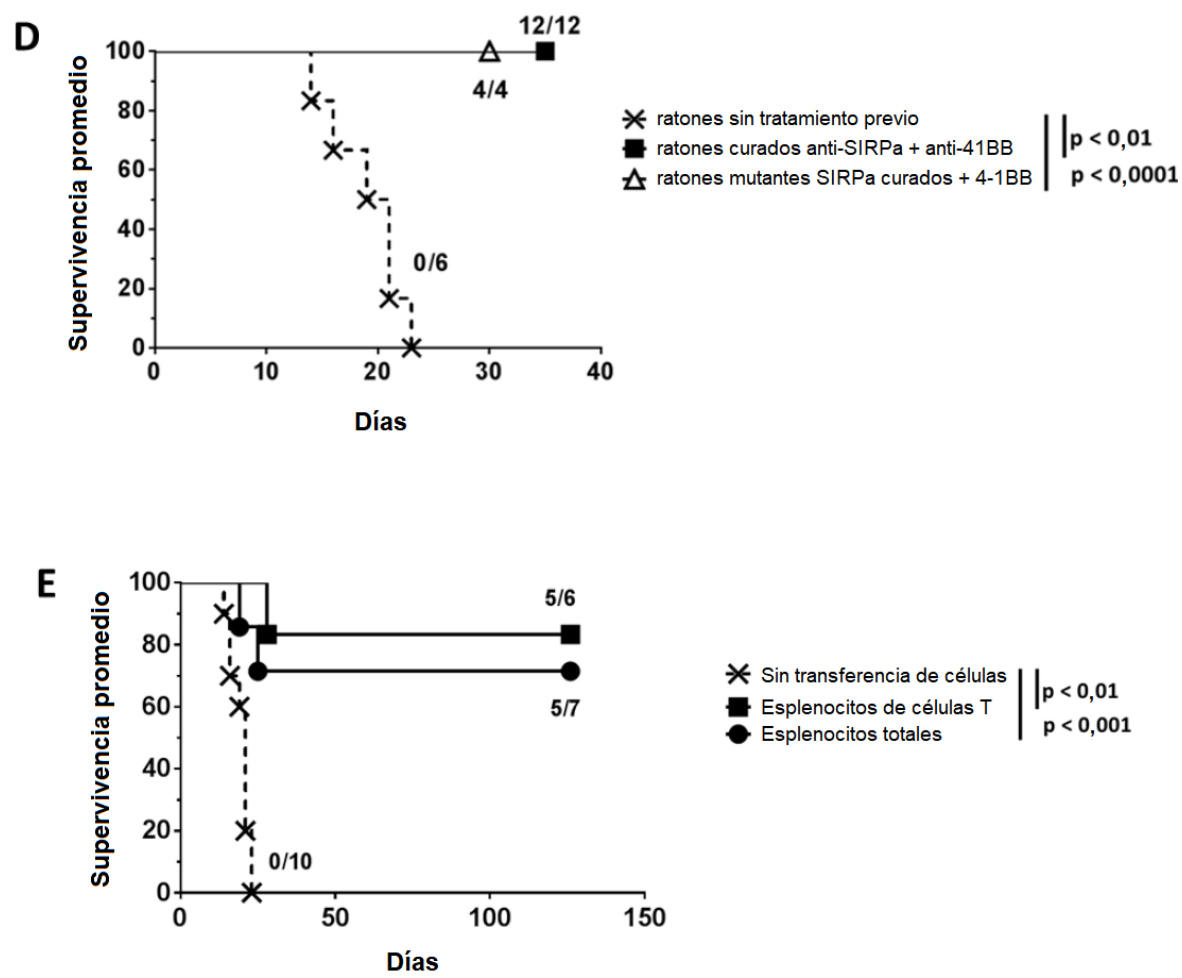


FIGURA 15 (fin)

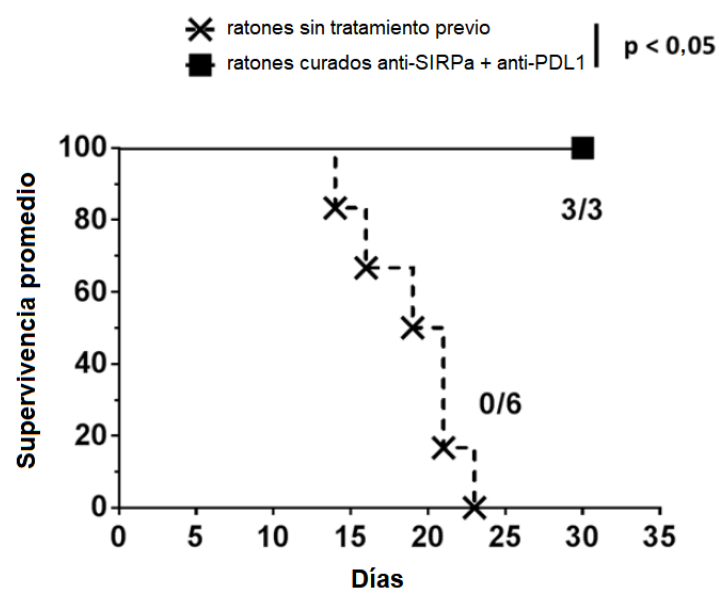


FIGURA 16

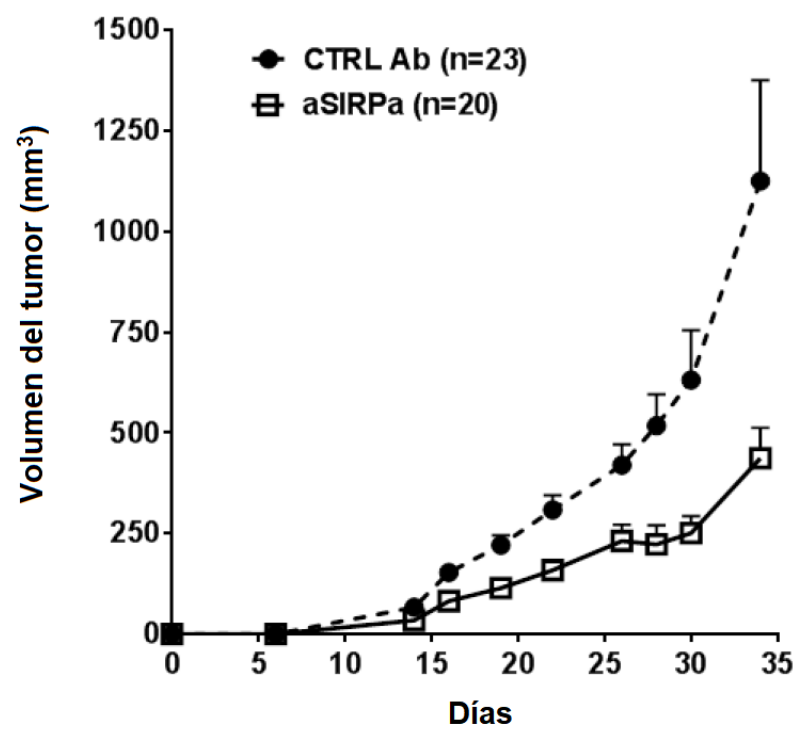


FIGURA 17

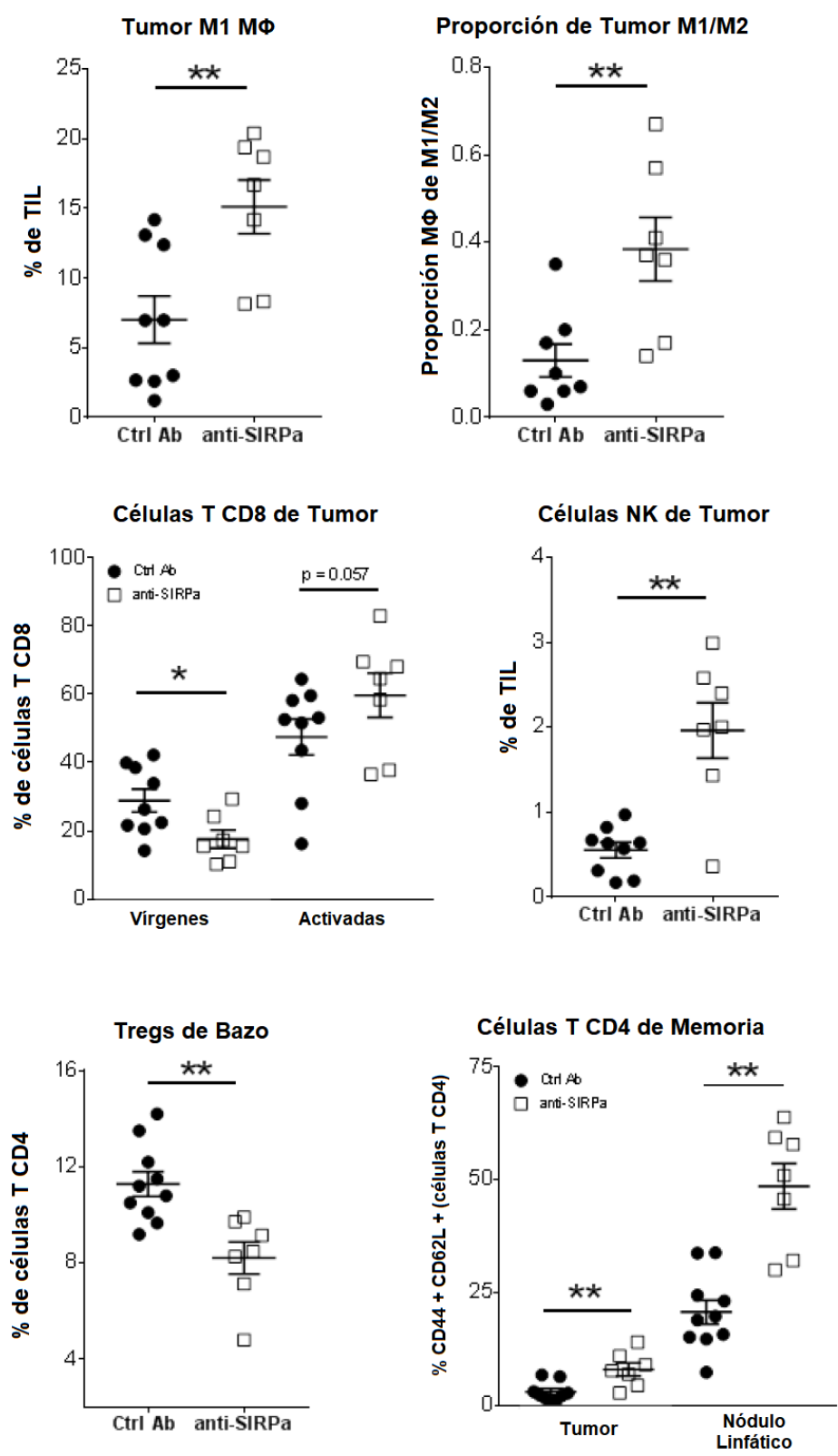


FIGURA 18

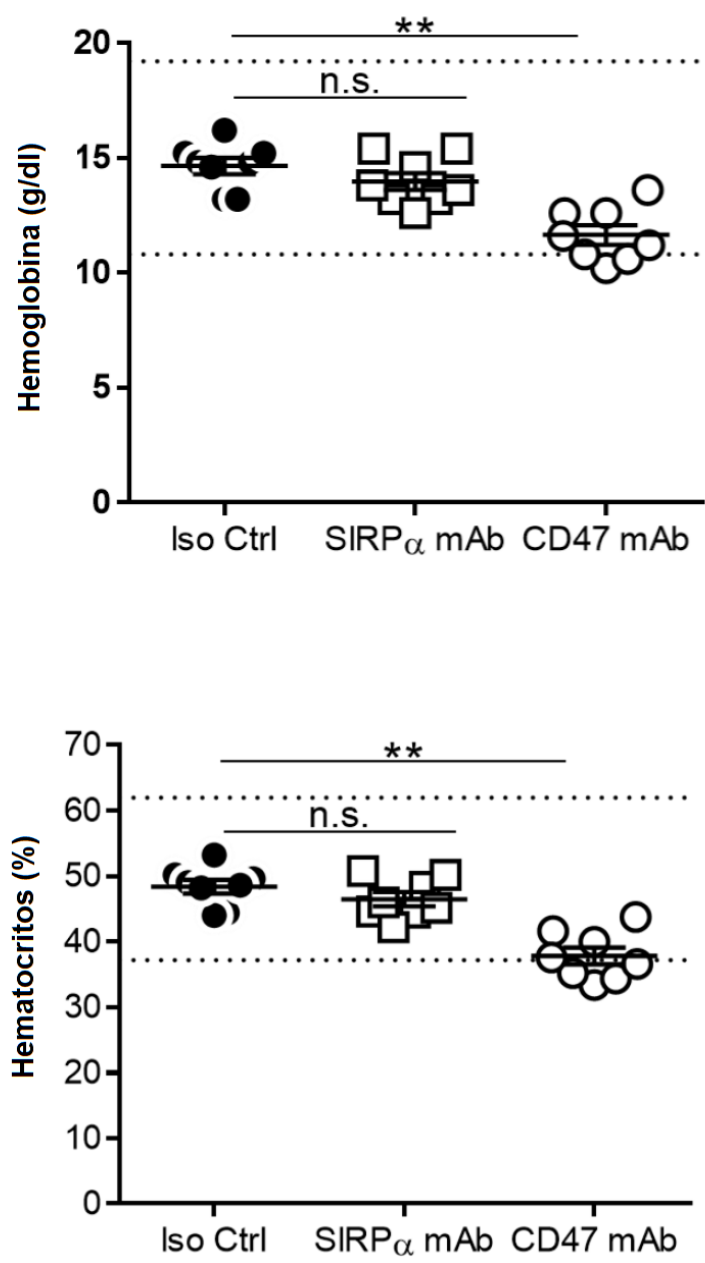


FIGURA 19

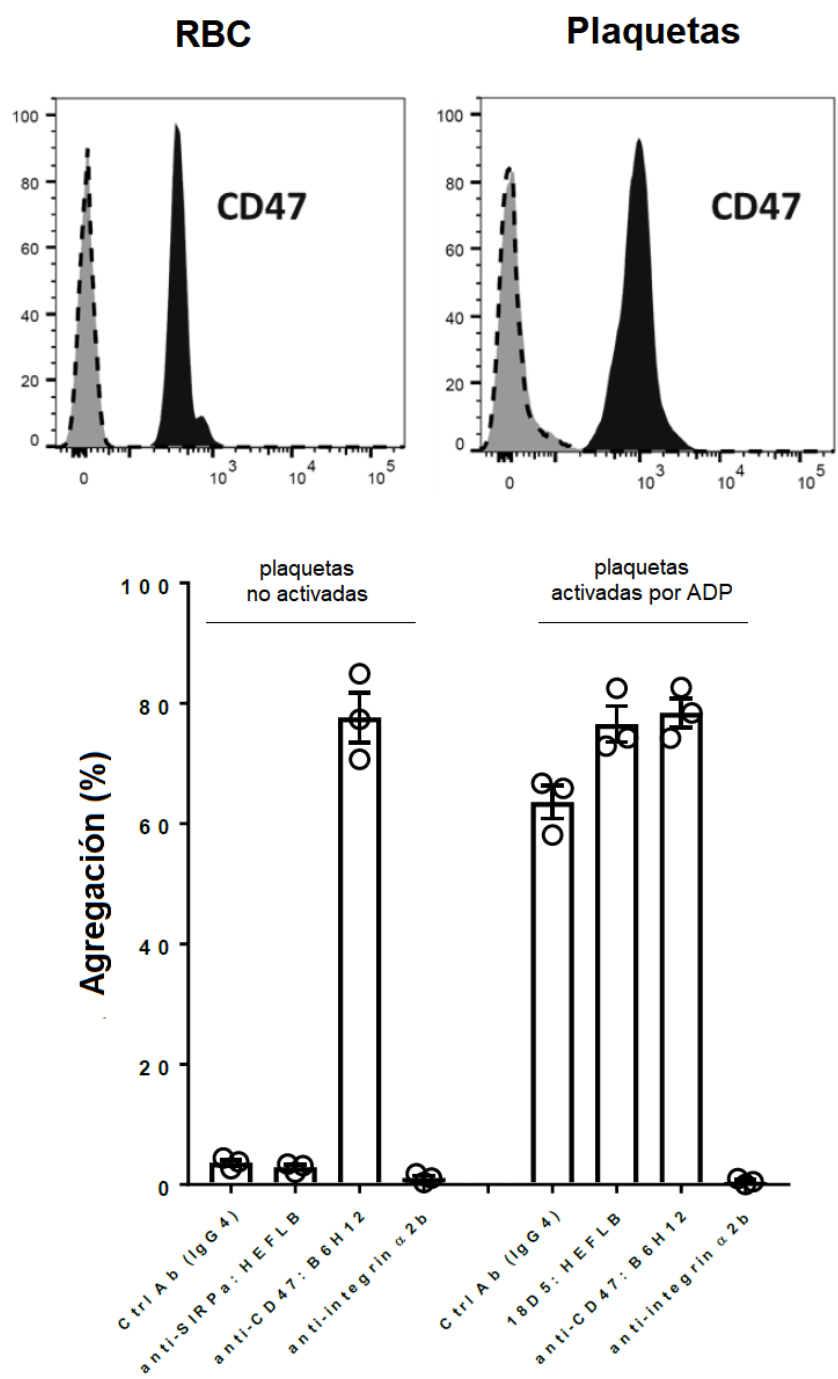


FIGURA 20

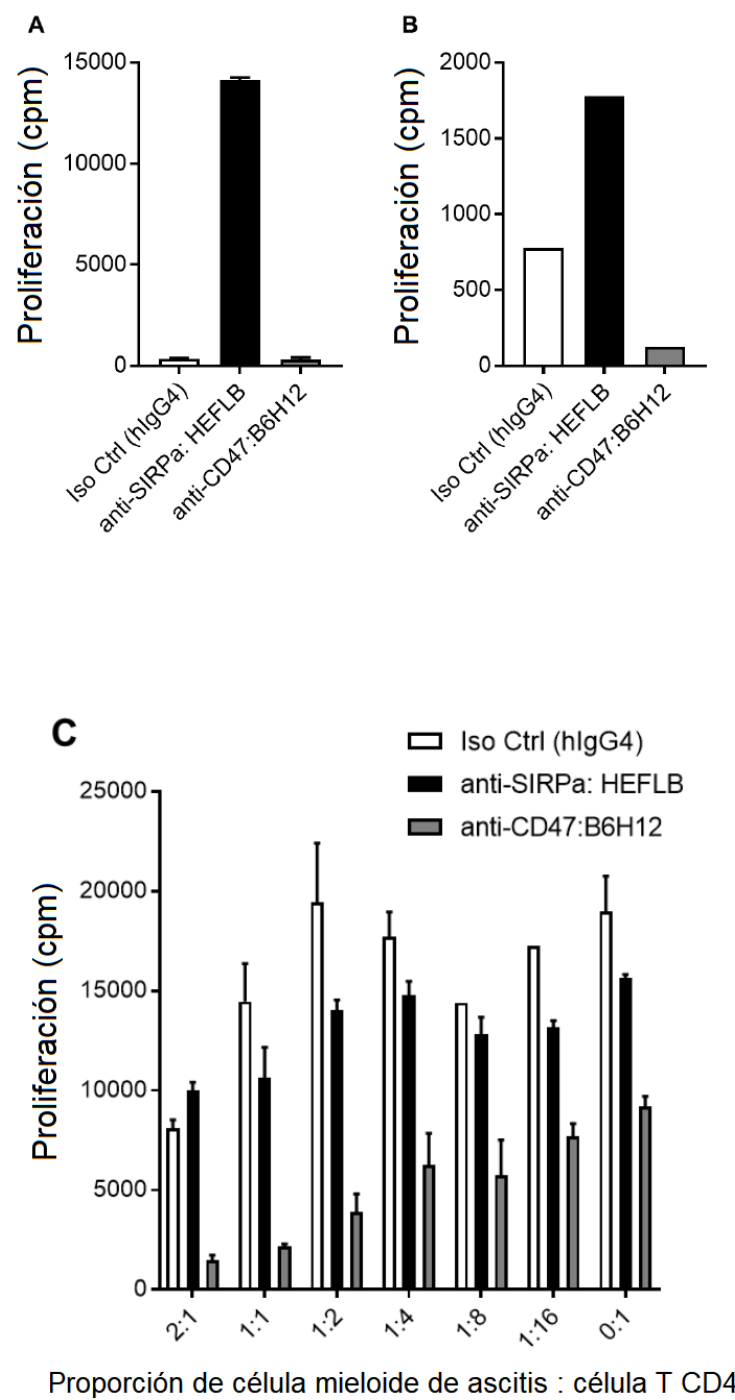


FIGURA 21