

ANTICUERPOS MONOCLONALES CD47 NOVEDOSOS Y USOS DE LOS MISMOSANTECEDENTES DE LA INVENCION

La CD47 (Agrupación de Diferenciación 47) primero se identificó como un antígeno de tumor en cáncer ovárico humano en los años de 1980. Desde entonces, CD47 se ha encontrado que se expresa en múltiples tipos de tumor humano que incluyen leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda (ALL), linfoma no de Hodgkin (NHL), mieloma múltiple (MM), cáncer de vejiga y otros tumores sólidos. Altos niveles de CD47 permiten a las células de cáncer evitar la fagocitosis a pesar de tener un nivel más alto de calreticulina - la señal pro-fagocítica dominante.

También conocida como proteína asociada a integrina (IAP), el antígeno de cáncer ovárico OA3, antígeno relacionado a Rh y MER6, CD47 es un receptor de transmembrana de múltiple extensión que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulina. Su expresión y actividad se ha implicado en un número de enfermedades y trastornos. Está es una glicoproteína de transmembrana ampliamente expresada con un solo dominio similar a Ig y cinco regiones que abarcan membrana, la cual funciona como un ligando celular para SIRP α con el enlace mediado a través del dominio similar a V NH₂-terminal de la proteína reguladora de señal α (SIRP α). SIRP α se expresa principalmente en células mieloides, que incluyen

macrófagos, granulocitos, células dendríticas mieloides (DCs), mastocitos y sus precursores que incluyen células madre hematopoyéticas.

Los macrófagos limpian los patógenos y células
5 dañadas o envejecidas de la corriente sanguínea por la vía de fagocitosis. CD47 de superficie celular interactúa con su receptor en macrófagos, SIRP α , para inhibir la fagocitosis de células saludables, normales. SIRP α inhibe la fagocitosis de células hospederas mediante macrófagos, donde la ligación de
10 SIRP α en macrófagos mediante CD47 expresado en la célula objetivo del hospedero genera una señal inhibidora mediada por SHP-1 que regula negativamente la fagocitosis.

De acuerdo con la función de CD47 para inhibir la fagocitosis de células normales, hay evidencia de que es
15 transientemente regulada hacia arriba en células madre hematopoyéticas (HSCs) y progenitoras justo antes y durante su fase migratoria, y que el nivel de CD47 en estas células determina la probabilidad de que son tragadas *in vivo*.

CD47 también es constitutivamente regulada hacia
20 arriba en un número de cánceres, que incluyen leucemias mieloides. La sobreexpresión de CD47 en una línea de leucemia mieloide incrementa su patogenicidad permitiéndole evadir la fagocitosis. Se ha concluido que la regulación hacia arriba de CD47 es un mecanismo importante para proporcionar
25 protección a las HSCs normales durante la movilización

mediada por inflamación, y que las progenitoras leucémicas co-optan estabilidad con el fin de evadir la exterminación con el macrófago.

Ciertos anticuerpos CD47 se han mostrado que
5 restauran la fagocitosis y previenen la aterosclerosis. Ver,
por ejemplo, Kojima y colaboradores, *Nature*, Vol. 36, 86-90
(Aug. 4, 2016). La presente invención proporciona anticuerpos
CD47 novedosos o fragmentos inmunológicamente activos de los
mismos que tienen baja inmunogenicidad en humanos y causan
10 bajo o nada de nivel de agotamiento de glóbulos rojos. Como
es bien conocido para una persona experta en la técnica,
tales anticuerpos se pueden llamar intercambiablemente
"anticuerpos anti-CD47".

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA PRESENTE INVENCIÓN

15 En un aspecto, la presente invención proporciona
anticuerpos monoclonales aislados y sus fragmentos
inmunológicamente activos que enlazan a CD47 humana. Por
brevedad, estos anticuerpos monoclonales aislados que enlazan
a CD47 y sus fragmentos inmunológicamente activos son
20 referidos en la presente después como "anticuerpos CD47". Los
anticuerpos CD47 de esta invención son capaces de modular,
por ejemplo, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar,
neutralizar o de otra manera interferir con, la expresión,
actividad y/o señalización de CD47, o la interacción entre
25 CD47 y SIRP α . Muy significativamente, los anticuerpos CD47 de

esta invención no causan generalmente un nivel significativo de agotamiento o hemaglutinación de glóbulos rojos humanos, y sorprendentemente en muchos casos no causan cualquier agotamiento o hemaglutinación de glóbulos rojos humanos en todas partes. Adicionalmente, los anticuerpos CD47 de esta invención tienen potentes actividades anti-tumor exhibidas.

En algunas modalidades, los anticuerpos CD47 de esta invención cada una incluyen (a) una secuencia de cadena pesada variable (VH) que es por lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 95%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 77; (b) una secuencia de cadena ligera variable (VL) que es por lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 95%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:

12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO:
 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO:
 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO:
 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO:
 5 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO:
 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO:
 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO:
 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO:
 76 y SEQ ID NO: 78.

10 En algunas otras modalidades, los anticuerpos CD47
 de esta invención cada uno incluyen secuencias de cadena
 VH/VL emparejadas que son por lo menos 90% (por ejemplo, por
 lo menos 95%, 95%, 96, 97%, 98%, 99% o 99.5%) idénticas a un
 par de secuencias de aminoácido VH y VL seleccionadas del
 15 grupo que consiste de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 (es decir,
 1A1), SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 (es decir, 1F8), SEQ ID NO:
 5 y SEQ ID NO: 6 (es decir, 2A11), SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO:
 8 (es decir, 2C2), SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 (es decir,
 2D7), SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 (es decir, 2G4), SEQ ID
 20 NO: 13 y SEQ ID NO: 14 (es decir, 2G11), SEQ ID NO: 15 y SEQ
 ID NO: 16 (es decir, 6F4), SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 (es
 decir, 5H1), SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 (es decir, 5F6),
 SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22 (es decir, 1F3), SEQ ID NO: 23
 y SEQ ID NO: 24 (es decir, 2A4), SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO:
 25 26 (es decir, 2B12), SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 (es decir,

13A11), SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 (es decir, 15E1), SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 (es decir, 13H3), SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34 (es decir, 14A8), SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 (es decir, 16H3), SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 (es decir, 1A1), SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40 (es decir, 1A1-A), SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 (es decir, 1A1-Q), SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44 (es decir, 1A2), SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 (es decir, 1A8), SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 (es decir, 1B1), SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50 (es decir, 1B2), SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52 (es decir, 1H3), SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 (es decir, 1H3-Q), SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56 (es decir, 1H3-A), SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58 (es decir, 2A2), SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60 (es decir, 2A3), SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62 (es decir, 2A6), SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64 (es decir, 2A10), SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66 (es decir, 2B1), SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68 (es decir, 2C6), SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70 (es decir, 2E7), SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72 (es decir, 2E9), SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 74 (es decir, 2F1), SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 76 (es decir, 2F3) y SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78 (es decir, 34C5). En algunos casos, los anticuerpos CD47 de esta invención cada uno incluyen un par de secuencias de cadena VH y VL seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 (es decir, 1A1), SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 (es decir, 1F8), SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 (es decir, 2A11), SEQ ID NO: 7 y SEQ

ID NO: 8 (es decir, 2C2), SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 (es
 decir, 2D7), SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 (es decir, 2G4),
 SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 (es decir, 2G11), SEQ ID NO: 15
 y SEQ ID NO: 16 (es decir, 6F4), SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO:
 5 18 (es decir, 5H1), SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 (es decir,
 5F6), SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22 (es decir, 1F3), SEQ ID
 NO: 23 y SEQ ID NO: 24 (es decir, 2A4), SEQ ID NO: 25 y SEQ
 ID NO: 26 (es decir, 2B12), SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 (es
 decir, 13A11), SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 (es decir,
 10 15E1), SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 (es decir, 13H3), SEQ ID
 NO: 33 y SEQ ID NO: 34 (es decir, 14A8), SEQ ID NO: 35 y SEQ
 ID NO: 36 (es decir, 16H3), SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 (es
 decir, 1A1), SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40 (es decir, 1A1-A),
 SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 (es decir, 1A1-Q), SEQ ID NO:
 15 43 y SEQ ID NO: 44 (es decir, 1A2), SEQ ID NO: 45 y SEQ ID
 NO: 46 (es decir, 1A8), SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 (es
 decir, 1B1), SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50 (es decir, 1B2),
 SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52 (es decir, 1H3), SEQ ID NO: 53
 y SEQ ID NO: 54 (es decir, 1H3-Q), SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO:
 20 56 (es decir, 1H3-A), SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58 (es
 decir, 2A2), SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60 (es decir, 2A3),
 SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62 (es decir, 2A6), SEQ ID NO: 63
 y SEQ ID NO: 64 (es decir, 2A10), SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO:
 66 (es decir, 2B1), SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68 (es decir,
 25 2C6), SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70 (es decir, 2E7), SEQ ID

NO: 71 y SEQ ID NO: 72 (es decir, 2E9), SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 74 (es decir, 2F1), SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 76 (es decir, 2F3) y SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78 (es decir, 34C5).

Los anticuerpos CD47 de esta invención pueden ser
5 quiméricos o humanizados. Ellos pueden prevenir o reducir significativamente a CD47 humana de interactuar con SIRP α , o promueven la fagocitosis mediada por macrófago de una célula que expresa CD47.

Los anticuerpos CD47 de esta invención no causan un
10 nivel significativo o notable de hemaglutinación o agotamiento de glóbulos rojos, y en muchos casos no causan hemaglutinación o agotamiento de glóbulos rojos en todo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales biespecíficos aislados. Cada uno de
15 tales anticuerpos monoclonales biespecíficos aislados comprende un primer brazo y un segundo brazo, en donde el primer brazo comprende un primer anticuerpo monoclonal o fragmento inmunológicamente activo del mismo como es descrito en lo anterior que enlaza a CD47 humana, y el segundo brazo
20 comprende un segundo anticuerpo monoclonal que no enlaza a CD47 humana.

En algunas modalidades, el segundo brazo en los anticuerpos monoclonales biespecíficos aislados enlaza una célula de cáncer.

25 En algunas otras modalidades, los anticuerpos

monoclonales biespecíficos inhiben la interacción entre CD47 humana y SIRP α humana.

En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas cada una que contiene
5 uno de los anticuerpos CD47 de esta invención o un anticuerpo monoclonal biespecífico aislado de esta invención, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como se utiliza en la presente, el término "portador o excipiente farmacéuticamente aceptable" se
10 refiere a un portador o un excipiente que es útil para preparar una composición o formulación farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica, y no biológicamente ni de otra manera indeseable. Un portador o excipiente empleado típicamente es uno adecuado para la administración a sujetos
15 humanos u otros mamíferos. Al hacer las composiciones, el ingrediente activo usualmente se mezcla con, diluye por, o se encierra con un portador o excipiente. Cuando el portador o excipiente sirve como un diluyente, éste puede ser un material sólido, semi-sólido o líquido, que actúa como un
20 vehículo, portador o medio para el ingrediente activo del anticuerpo.

También dentro del alcance de la presente invención está un método para tratar una enfermedad en un sujeto humano en necesidad del mismo, y el método incluye administrar al
25 sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un

anticuerpo CD47 de esta invención, un anticuerpo monoclonal
bienespecífico de esta invención, o una composición
farmacéutica de esta invención, y la enfermedad es un cáncer,
una enfermedad fibrótica o cualquier enfermedad relacionada
5 con la inhibición de fagocitosis. En algunos casos, el cáncer
se puede seleccionar del grupo que consiste de cáncer
ovárico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón,
cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer
colorrectal, cáncer pancreático, linfoma no de Hodgkin,
10 leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica,
leucemia mieloide aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia
de célula pilosa (HCL), leucemia prolinfocítica de célula T
(T-PLL), leucemia linfocítica granular grande, leucemia de
célula T de adulto, mieloma múltiples, melanoma, leiomioma,
15 leiomiosarcoma, glioma, glioblastoma, mielomas, leucemias
monocíticas, leucemias derivadas de célula B, leucemias
derivadas de célula T, linfomas derivados de célula B,
linfomas derivados de célula T, cáncer del endometrio, cáncer
de riñón, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de tiroides,
20 cáncer de cervical, cáncer gástrico, cáncer de hígado y
tumores sólidos; mientras que la enfermedad fibrótica se
puede seleccionar del grupo que consiste de infarto
miocárdico, angina, osteoartritis, fibrosis pulmonar, asma,
fibrosis cística, bronquitis y asma. Ejemplos de tumores
25 sólidos incluyen, por ejemplo, cáncer del endometrio, cáncer

de tiroides, cáncer cervical, cáncer gástrico, tumores de
mama, tumores ováricos, tumores del pulmón, tumores
pancreáticos, tumores de próstata, tumores de melanoma,
tumores colorrectales, tumores de pulmón, tumores de cabeza y
5 cuello, tumores de vejiga, tumores esofágicos, tumores de
hígado y tumores de riñón y tumores CNS derivados del
neuroblasto. La enfermedad relacionada con la inhibición de
fagocitosis puede ser una enfermedad cardiovascular (por
ejemplo, aterosclerosis, ataque apoplético, enfermedad
10 cardíaca hipertensiva, enfermedad cardíaca reumática,
cardiomiopatía, arritmia del corazón, enfermedad cardíaca
congénita, enfermedad cardíaca valvular, carditis, aneurismas
aórticos, enfermedad de la arteria periférica o trombosis
venosa).

15 Como se utiliza en la presente, el término
"cantidad efectiva" se refiere a aquella cantidad de un
anticuerpo CD47 suficiente o requerida para efectuar el
tratamiento, pronóstico o diagnóstico de una enfermedad
asociada con señalización dependiente de CD47, como es
20 descrito en la presente, cuando se administra a un sujeto.
Las cantidades terapéuticamente efectivas de anticuerpos
proporcionados en la presente, cuando se utilizan solos o en
combinación, variará dependiendo de la actividad relativa de
los anticuerpos (por ejemplo, que promueven la fagocitosis
25 mediada por macrófago de células de cáncer que expresan CD47)

y dependiendo del sujeto y la condición de enfermedad que es tratada, el peso y la edad del sujeto, la severidad de la condición de enfermedad, la manera de administración y los similares, que se puede determinar fácilmente por uno de
5 habilidad ordinaria en la técnica.

Como se utiliza en la presente, el término "aislado" precedente a un anticuerpo CD47 de esta invención significa que el anticuerpo está sustancialmente libre de otro material celular. En una modalidad, un anticuerpo
10 aislado está sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie. En otra modalidad, un anticuerpo aislado se expresa por una célula de una especie diferente y está sustancialmente libre de otras proteínas de la especie diferente. Una proteína se puede volver sustancialmente libre
15 de componentes naturalmente asociados (o componentes asociados con el sistema de expresión celular utilizado para producir el anticuerpo) mediante aislamiento, utilizando técnicas de purificación de proteína bien conocidas en el arte. En una modalidad, los anticuerpos, o fragmentos de
20 enlace de antígeno de la invención son aislados.

Todavía dentro del alcance de esta invención están proteínas de fusión cada una que comprende una primera secuencia de aminoácidos y una segunda secuencia de aminoácidos, en donde la primera secuencia de aminoácidos es
25 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ

ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 o SEQ ID NO: 77, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 95%) idéntica a la misma; y la segunda secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76 o SEQ ID NO: 78, o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 95%) idéntica a la misma.

En algunas modalidades, una proteína de fusión de esta invención incluye una combinación de la primera

secuencia de aminoácidos y la segunda secuencia de
 aminoácidos, y la combinación de estas dos secuencias de
 aminoácidos es SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 (es decir, 1A1),
 SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 (es decir, 1F8), SEQ ID NO: 5 y
 5 SEQ ID NO: 6 (es decir, 2A11), SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8
 (es decir, 2C2), SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 (es decir,
 2D7), SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 (es decir, 2G4), SEQ ID
 NO: 13 y SEQ ID NO: 14 (es decir, 2G11), SEQ ID NO: 15 y SEQ
 ID NO: 16 (es decir, 6F4), SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 (es
 10 decir, 5H1), SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 (es decir, 5F6),
 SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22 (es decir, 1F3), SEQ ID NO: 23
 y SEQ ID NO: 24 (es decir, 2A4), SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO:
 26 (es decir, 2B12), SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 (es decir,
 13A11), SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 (es decir, 15E1), SEQ
 15 ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 (es decir, 13H3), SEQ ID NO: 33 y
 SEQ ID NO: 34 (es decir, 14A8), SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36
 (es decir, 16H3), SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 (es decir,
 1A1), SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40 (es decir, 1A1-A), SEQ ID
 NO: 41 y SEQ ID NO: 42 (es decir, 1A1-Q), SEQ ID NO: 43 y SEQ
 20 ID NO: 44 (es decir, 1A2), SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 (es
 decir, 1A8), SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 (es decir, 1B1),
 SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50 (es decir, 1B2), SEQ ID NO: 51
 y SEQ ID NO: 52 (es decir, 1H3), SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO:
 54 (es decir, 1H3-Q), SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56 (es
 25 decir, 1H3-A), SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58 (es decir, 2A2),

SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60 (es decir, 2A3), SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62 (es decir, 2A6), SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64 (es decir, 2A10), SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66 (es decir, 2B1), SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68 (es decir, 2C6), SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70 (es decir, 2E7), SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72 (es decir, 2E9), SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 74 (es decir, 2F1), SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 76 (es decir, 2F3), SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78 (es decir, 34C5) o una combinación que es por lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 95%) idéntica a la misma para cada una de la primera y segunda secuencias de aminoácidos.

En algunas otras modalidades, una proteína de fusión de esta invención incluye una combinación de la primera secuencia de aminoácidos y la segunda secuencia de aminoácidos, y la combinación de estas dos secuencias de aminoácidos es SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 (es decir, 1A1), SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 (es decir, 1F8), SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 (es decir, 2A11), SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 (es decir, 2C2), SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 (es decir, 2D7), SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 (es decir, 2G4), SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 (es decir, 2G11), SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 (es decir, 6F4), SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 (es decir, 5H1), SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 (es decir, 5F6), SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22 (es decir, 1F3), SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24 (es decir, 2A4), SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO:

26 (es decir, 2B12), SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 (es decir, 13A11), SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 (es decir, 15E1), SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 (es decir, 13H3), SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34 (es decir, 14A8), SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36
 5 (es decir, 16H3), SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 (es decir, 1A1), SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40 (es decir, 1A1-A), SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 (es decir, 1A1-Q), SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44 (es decir, 1A2), SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 (es decir, 1A8), SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 (es decir, 1B1),
 10 SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50 (es decir, 1B2), SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52 (es decir, 1H3), SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 (es decir, 1H3-Q), SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56 (es decir, 1H3-A), SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58 (es decir, 2A2), SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60 (es decir, 2A3), SEQ ID NO: 61
 15 y SEQ ID NO: 62 (es decir, 2A6), SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64 (es decir, 2A10), SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66 (es decir, 2B1), SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68 (es decir, 2C6), SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70 (es decir, 2E7), SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72 (es decir, 2E9), SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 74 (es
 20 decir, 2F1), SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 76 (es decir, 2F3) o SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78 (es decir, 34C5).

En todavía algunas otras modalidades, una proteína de fusión de esta invención además puede incluir una proteína adicional - además de la primera y segunda secuencias de
 25 aminoácidos. La proteína adicional es un anticuerpo o una

citocina.

En aún todavía algunas otras modalidades, una proteína de fusión de esta invención se puede conjugar con un agente terapéutico de molécula pequeña (por ejemplo, agente anti-cáncer o anti-inflamación) o un marcador (por ejemplo, un marcador biológico o marcador fluorescente).

En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona epítomos inmunodominantes codificados por el gen CD47 que comprende una proteína recombinante que contiene conformacionalmente un bucle TNMEAQ (residuos 26-31), T34, E35, L74 y una bisagra LTR (residuos 101-103) de CD47.

En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas biológicas que específicamente enlaza a un epítomo conformacional que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un bucle TNMEAQ (residuos 26-31), T34, E35, L74 y una bisagra LTR (residuos 101-103) de CD47, en donde el anticuerpo puede enlazar específicamente a CD47.

Como se utiliza en la presente, el término "moléculas biológicas" se propone para incluir anticuerpos sintéticos (monoclonales o biespecíficos), péptidos y moléculas biomiméticas. El término "moléculas biomiméticas" se refiere a moléculas que se diseñan o se desarrollan para tener estructuras o propiedades similares a o semejantes a aquellas de los compuestos grandes que ocurren naturalmente tales como proteínas o nucleótidos y que tienen un peso

molecular de, por ejemplo, por lo menos 3,000, por lo menos 5,000 o por lo menos 10,000.

Todas las referencias citadas en la presente se incorporan por referencia en su totalidad.

5 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Fig. 1 muestra la respuesta dependiente de dosis de los anticuerpos CD47 que enlazan a CD47-ECD monomérico.

La Fig. 2a y Fig. 2b muestran la respuesta dependiente de dosis de anticuerpos CD47 que enlazan a CD47-
10 ECD dimérico.

La Fig. 3a, Fig. 3b y Fig. 3c muestra la respuesta dependiente de dosis de los anticuerpos CD47 que bloquean el enlace de CD47 a SIRP α .

La Fig. 4a y la Fig. 4b muestran la respuesta
15 dependiente de dosis de los anticuerpos CD47 que enlazan a células Raji CD47+; y la Fig. 4c, Fig. 4d y Fig. 4e muestran la cinética de enlace y los datos de anticuerpos CD47 como es medido mediante el análisis Biocore.

La Fig. 5a y la Fig. 5b muestran la fagocitosis de
20 células de tumor por M Φ humano con anticuerpos CD47.

Las Figs. 6a-6c muestran la fagocitosis mediada por macrófago de varias líneas de células de cáncer de sangre humana activadas por anticuerpos CD47.

Las Figs. 7a y 7b muestran propiedades que modelan
25 glóbulos rojos (RBC) en el ensayo de aglutinación de RBC con

anticuerpos CD47.

Las Figs. 8a, 8b, 8c y 8d muestran actividades para enlazar a RBC e inducir la aglutinación de RBC mediante anticuerpos CD en diferentes y más altas dosis.

5 Las Figs. 9a, 9b, 9c y 9d muestran actividades de enlace de RBC de los anticuerpos CD47.

La Fig. 10 muestra resultados de la aglutinación de glóbulos rojos a través de múltiples muestras de sangre humana inducidos por anticuerpos CD47.

10 La Fig. 11 muestra las actividades de enlace de plaqueta humana de los anticuerpos CD47 y la fusión SIRP α -Ig, con CD61 manchado como un marcador de superficie para plaquetas.

La Fig. 12 muestra los resultados de prueba de
15 aglutinación de glóbulos rojos de mono cynomolgus inducido por anticuerpos CD47 y la fusión SIRP α -Ig in vitro.

La Fig. 13 muestra los resultados de prueba de fagocitosis y células AML que enlazan por anticuerpos CD47 y el control.

20 La Fig. 14a y Fig. 14b muestran la eficacia de tratamientos con anticuerpos CD47 y el control en los ratones de xenoinjerto de luciferasa-Raji.

La Fig. 15 muestra la polarización del macrófago en ratones que llevan tumor inducido por anticuerpos CD47 y el
25 control.

La Fig. 16 muestra los perfiles de expresión CD47 utilizando muestras PDX de varios tipos de cáncer humano.

La Fig. 17 muestra resultados del estudio de farmacia de seguridad (hematología) en monos cynomolgus.

5 La Fig. 18 muestra la completación en el enlace de CD47 entre los anticuerpos 1F8 y 5F9, y entre los anticuerpos 1F8 y 2A1, debido a sus diferentes epítomos, y estructuras del complejo 5F9/CD47 y el complejo 1F8/CD47.

10 Las Figs. 19a, 19b, 19c, 19d, 19e, 19f, 19g y 19h muestran los efectos del anticuerpo CD47, 13H3 en la congregación de RBC, hemoglobina, plaquetas y linfocitos, respectivamente.

La Fig. 20 muestra la fuerte afinidad de enlace de 34C5 a CD47-ECD recombinante.

15 La Fig. 21 muestra la fuerte afinidad de enlace de 34C5 a células Raji que llevan CD47.

La Fig. 22 muestra que 34C5 fue capaz de bloquear efectivamente el enlace de CD47 a SIRP α , con una EC₅₀ de 0.30 nM.

20 La Fig. 23 muestra que el anticuerpo 34C5 promovió la fagocitosis de células de tumor por M Φ humano.

La Fig. 24 muestra el anticuerpo 34C5 que no causó aglutinación de RBC *in vitro*.

25 La Fig. 25 muestra que el anticuerpo 34C5 disminuye su enlace a RBC con la concentración disminuida de este

anticuerpo.

La Fig. 26 muestra las secuencias de aminoácidos de algunos anticuerpos CD47 de esta invención y sus secuencias de nucleótidos respectivas.

5 La Fig. 27 muestra la secuencia de aminoácidos para el dominio similar a inmunoglobulina (Ig-V) de CD47, 19-141.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona anticuerpos CD47 monoclonales aislados novedosos que pueden prevenir a CD47
 10 humana de interactuar con SIRP α , o promover la fagocitosis mediada por macrófago de una célula que expresa CD47. Estos anticuerpos CD47 no causan un nivel significativo o notable de hemaglutinación o agotamiento de glóbulos rojos, y en muchos casos no causan hemaglutinación o agotamiento de
 15 glóbulos rojos en todo.

Como ejemplos, un anticuerpo CD47 de la invención incluiría (a) una secuencia de cadena pesada variable (VH) que es por lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 95%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del
 20 grupo que consiste de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37,
 25 SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45,

SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53,
SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61,
SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69,
SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 77;
5 y (b) una secuencia de cadena ligera variable (VL) que es por
lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 95%) idéntica a una
secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste
de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8,
SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16,
10 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24,
SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32,
SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40,
SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48,
SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56,
15 SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64,
SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72,
SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76 y SEQ ID NO: 78. En algunos
casos adicionales, un anticuerpo CD47 de esta invención
incluiría una secuencia de cadena VH/VL combinada que es por
20 lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 95%) idéntica a una
secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste
de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4,
SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, SEQ
ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, SEQ
25 ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, SEQ

ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20, SEQ
 ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24, SEQ
 ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28, SEQ
 ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32, SEQ
 5 ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36, SEQ
 ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40, SEQ
 ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44, SEQ
 ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48, SEQ
 ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52, SEQ
 10 ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56, SEQ
 ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60, SEQ
 ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64, SEQ
 ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68, SEQ
 ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72, SEQ
 15 ID NO: 73 y SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 76 y
 SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78.

Como se utiliza en la presente, el término
 "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y
 específicamente cubre anticuerpos monoclonales (que incluyen
 20 anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos
 policlonales, anticuerpos multi-específicos (por ejemplo,
 anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo
 mientras que exhiban la actividad biológica deseada. Los
 "Anticuerpos" (o "Abs") y "inmunoglobulinas" (o "Igs") son
 25 glicoproteínas que tienen las mismas características

estructurales. Mientras que los anticuerpos exhiben especificidad de enlace a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpo que carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos de esta última clase, por ejemplo, se producen en bajos niveles por el sistema linfático y en niveles incrementados por mielomas.

Como se utiliza en la presente, el término "epítopo" significa cualquier determinante antigénico sobre un antígeno para el cual el parátipo de un anticuerpo enlaza. Los determinantes epitópicos usualmente consisten de agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y usualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Como se utiliza en la presente, el término "anticuerpos nativos e inmunoglobulinas" son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150,000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada por un enlace de disulfuro covalente (también llamado "par VH/VL"), mientras que el número de enlaces de disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada

cadena pesada y ligera también tiene puentes de disulfuro de intracadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Los residuos de aminoácido particulares se refiere que forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y pesada. Ver, por ejemplo, Clothia y colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 186:651 (1985); Novotny and haber, *proc. Natl Acad Sci. U.S.A.*, 82:4592 (1985).

Como se utiliza en la presente, el término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensivamente en secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en el enlace y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por todos los dominios variables de anticuerpos. Esta se concentra en tres segmentos llamados regiones de determinación de complementariedad (CDRs) o regiones hipervariables en ambos de los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. Las porciones más altamente

conservadas de dominios variables son llamados la estructura (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativos cada uno comprenden cuatro regiones FR, que adoptan grandemente una configuración de lámina β , conectado por tres

5 CDRs, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, que forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDRs en cada cadena se mantienen conjuntamente de estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de enlace de antígeno de

10 los anticuerpos. Ver, por ejemplo, Kabat y colaboradores, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. (1991). Los dominios constantes no se involucran directamente en el enlace de un anticuerpo a un antígeno, pero exhibe varias

15 funciones efectoras, tal como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo. Las secuencias de región variable de interés incluyen las secuencias de región variable humanizadas proporcionadas para anticuerpos CD47. Por ejemplo, 1A1 incluye SEQ ID NO: 1

20 (pesada) y SEQ ID NO: 2 (ligera), 1F8 incluye SEQ ID NO: 3 (pesada) y SEQ ID NO: 4 (ligera) y 2A11 incluye SEQ ID NO: 5 (pesada) y SEQ ID NO: 6 (ligera).

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de enlace de antígeno idénticos, llamados

25 fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de enlace de

antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su habilidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y es todavía capaz de la reticulación de antígeno.

5 de antígeno. "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y enlace de antígeno completo. En una especie Fv de dos cadenas, esta región consiste de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación no covalente, hermética. En una

10 especie Fv de una sola cadena (scFv), un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera se puede enlazar covalentemente por un enlazador de péptido flexible tal que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a aquella en una especie Fv de

15 dos cadenas. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de enlace de antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDRs confieren especificidad de enlace de antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aún un solo

20 dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende únicamente tres CDRs específicas para un antígeno) tiene la habilidad para reconocer y enlazar a antígeno, aunque una menor afinidad que el sitio de enlace completo. Ver, por ejemplo, Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal*

25 *Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-

Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH_1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos del carboxi terminal del dominio de cadena pesada CH_1 que incluye una o más cisteínas de la región de bisagra de anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente para Fab' en la cual el residuo(s) de cisteína de los dominios constante lleva un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo también son conocidos.

Hay cinco clases mayores de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas además se pueden dividir en subclases (isotipos) por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas son llamados α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Como se utiliza en la presente, el término "fragmento de anticuerpo", y todas las variantes gramaticales del mismo, se definen como porción de un anticuerpo intacto

que comprende el sitio de enlace de antígeno o región variable del anticuerpo intacto, en donde la porción está libre de los dominios de cadena pesada constantes (es decir CH2, CH3 y CH4, dependiendo del isotipo de anticuerpo) de la

5 región Fc del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que es un polipéptido que tiene una estructura primaria que consiste de una secuencia no interrumpida de residuos de

10 aminoácido contiguos (referidos en la presente como un "fragmento de anticuerpo de una sola cadena" o "polipéptido de una sola cadena"), que incluye sin limitación (1) moléculas de Fv de una sola cadena (scFv), (2) polipéptidos de una sola cadena que contienen únicamente un dominio

15 variable de cadena ligera, o un fragmento del mismo que contiene las tres CDRs del dominio variable de cadena ligera, sin una porción de cadena pesada asociada y (3) polipéptidos de una sola cadena que contienen únicamente una región variable de cadena pesada, o un fragmento del mismo que

20 contiene las tres CDRs de la región variable de cadena pesada, sin una porción de cadena ligera asociada; y estructuras multi-específicas o multivalentes formadas de fragmentos de anticuerpo. En un fragmento de anticuerpo que comprende una o más cadenas pesadas, la cadena(s) pesada

25 puede contener cualquier secuencia de dominio constante (por

ejemplo, CH1 en el isotipo IgG) encontrado en una región no Fc de un anticuerpo intacto, y/o puede contener cualquier secuencia de región de bisagra encontrada en un anticuerpo intacto, y/o puede contener una secuencia de cremallera de leucina fusionada o situada en la secuencia de región de bisagra o la secuencia de dominio constante de la cadena(s) pesada.

A menos que se indique específicamente lo contrario, el término "conjugado" utilizado en la presente se define como una molécula heterogénea formada por la unión covalente de uno o más fragmentos de anticuerpo a una o más moléculas de polímero, en donde la molécula heterogénea es soluble en agua, es decir soluble en fluidos fisiológicos tal como sangre, y en donde la molécula heterogénea está libre de cualquier agregado estructurado. Un conjugado de interés es polietilenglicol (PEG). En el contexto de la definición anterior, el término "agregado estructurado" se refiere a (1) cualquier agregado de moléculas en solución acuosa que tiene una estructura de cubierta esferoide o de esfera, tal que la molécula heterogénea no es una micela u otra estructura de emulsión, y no es anclada a una bicapa de lípido, vesícula o liposoma; y (2) cualquier agregado de moléculas en forma sólida o no solubilizada, tal como la matriz de cuenta de cromatografía, que no libera la molécula heterogénea en solución en contacto con una fase acuosa. Por consiguiente,

el término "conjugado" como se define en la presente abarca la molécula heterogénea mencionada en lo anterior en un precipitado, sedimento, matriz bioerosionable u otro sólido capaz de liberar la molécula heterogénea en solución acuosa en la hidratación del sólido.

Como se utiliza en la presente, el término "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un solo sitio antigénico. Cada mAb se dirige contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se pueden sintetizar por el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como es obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se va a considerar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizan de acuerdo con la presente invención se pueden hacer en una célula B inmortalizada o hibridoma de la misma, o se puede hacer por métodos de ADN

recombinantes.

Los anticuerpos monoclonales en la presente incluyen anticuerpos híbridos y recombinantes producidos mediante el empalme de un dominio variable (que incluye
5 hipervariable) de un anticuerpo CD47 con un dominio constante (por ejemplo, anticuerpos "humanizados") o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, sin considerar la especie de origen o clase o designación de
10 clase o subclase de inmunoglobulina, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, $F(ab')_2$ y Fv) mientras que exhiban la actividad biológica deseada.

Los anticuerpos monoclonales en la presente específicamente incluyen anticuerpos "quiméricos"
15 (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena(s)
20 idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenece a otra clase o sub-clase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, mientras que exhiban la actividad biológica deseada.

25 Como se utiliza en la presente, un anticuerpo

"aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas modalidades, el anticuerpo será purificado (1) a mayor que 75% en peso del anticuerpo como es determinado por el método de Lowry, y mucho más de preferencia más de 80%, 90% o 99% en peso, o (2) a homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones de reducción o de no reducción utilizando el azul de Coomassie, o de preferencia, el manchado con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ con células recombinantes puesto que por lo menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, el anticuerpo aislado será preparado por al menos una etapa de purificación.

Como se utiliza en la presente, el término "epítipo marcado" se refiere a un anticuerpo CD47 fusionado a una "marca de epítipo". El polipéptido de marca de epítipo tiene bastantes residuos para proporcionar un epítipo contra el cual se puede hacer un anticuerpo, todavía es bastante corto que no interfiere con la actividad del anticuerpo CD47. La marca de epítipo de preferencia es suficientemente única de modo que el anticuerpo específico para el epítipo no

reacciona de manera cruzada sustancialmente con otros epítomos. Los polipéptidos de marca adecuados generalmente tienen por lo menos 6 residuos de aminoácido y usualmente entre aproximadamente 8-50 residuos de aminoácido (de 5 preferencia entre aproximadamente 9-30 residuos). Ejemplos incluyen la marca c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 a los mismos (ver, por ejemplo, Evan y colaboradores, *Mot. Ceil. Biol.*, 5(12):3610-3616 (1985)); y la marca de glicoproteína D (gD) del virus de Herpes Simple y 10 su anticuerpo (ver, por ejemplo, Paborsky y colaboradores, *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)).

Como se utiliza en la presente, el término "etiqueta" se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directamente o indirectamente al anticuerpo. 15 La etiqueta por sí misma puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, etiquetas de radioisótopo o etiquetas fluorescentes), o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

20 Como se utiliza en la presente, el término "fase sólida" se refiere a una matriz no acuosa a la cual puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. Ejemplos de fases sólidas abarcadas en la presente incluyen aquellas parcialmente o completamente de vidrio (por ejemplo vidrio de 25 poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa),

poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas modalidades, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender la cavidad de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía por afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas. Ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,275,149.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que contienen estos anticuerpos CD47 y métodos para tratar enfermedades en un sujeto con estos anticuerpos CD47 o composiciones farmacéuticas.

Como se utiliza en la presente, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere a tanto el tratamiento terapéutico como medidas profilácticas o preventivas de una enfermedad (tal como cáncer o una enfermedad fibrótica). Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con una enfermedad así como aquellos en los cuales se va a prevenir la enfermedad.

Ejemplos de cáncer incluyen, pero no están limitados a, cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, linfoma no de Hodgkin, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mielógena crónica,

mieloma múltiple, melanoma, leiomioma, leiomiosarcoma, glioma, glioblastoma, mielomas, leucemias monocíticas, leucemias derivadas de célula B, leucemias derivadas de célula T, linfomas derivados de célula B, linfomas derivados de célula T y tumores sólidos. La enfermedad fibrótica puede ser, por ejemplo, infarto miocardiaco, angina, osteoartritis, fibrosis pulmonar, asma, fibrosis cística, bronquitis o asma.

Como se utiliza en la presente, el término "sujeto" para propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, que incluye humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, de deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. De preferencia, el mamífero es humano.

Los anticuerpos CD47 de esta invención también se pueden utilizar in vitro e in vivo para monitorear el curso de la terapia de enfermedad de CD47. De esta manera, por ejemplo, al medir el incremento o disminución en el número de células que expresan CD47, particularmente células de cáncer que expresan CD47, se puede determinar si un régimen terapéutico particular dirigido en aminorar la enfermedad es efectivo.

Los anticuerpos CD47 de esta invención se pueden utilizar en inmunoensayos in vitro en los cuales se pueden utilizar en fase líquida o enlazados a un portador de fase sólida. Además, los anticuerpos CD47 en estos inmunoensayos

se pueden marcar detectablemente de varias maneras. Ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar anticuerpos monoclonales de la invención son la citometría de flujo, por ejemplo FACS, MACS, inmunohistoquímica, inmunoensayos 5 competitivos y no competitivos en formato ya sea directo o indirecto. La detección de los antígenos utilizados en los anticuerpos CD47 de esta invención se puede hacer utilizando inmunoensayos que se corren ya sea en los modos hacia adelante, inverso o simultáneo, que incluyen ensayos 10 inmunohistoquímicos en muestras fisiológicas. Aquellos de habilidad en la técnica sabrán, o fácilmente pueden discernir, otros formatos de inmunoensayos sin experimentación indebida.

Los anticuerpos CD47 de la invención se pueden 15 enlazar a muchos portadores diferentes y utilizar para detectar la presencia de células que expresan CD47. Ejemplos de portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas 20 y magnetita. La naturaleza del portador puede ser ya sea soluble o insoluble para propósitos de la invención. Aquellos expertos en la técnica sabrán de otros portadores adecuados para enlazar a anticuerpos monoclonales, o serán capaces de averiguar a éstos, utilizando la experimentación de rutina.

Hay muchas marcas diferentes y métodos para marcar

conocidos para aquellos de habilidad ordinaria en la técnica, que encuentran uso como trazadores en métodos terapéuticos, para el uso en métodos de diagnóstico y los similares. Para propósitos de diagnóstico una marca se puede enlazar

5 covalentemente o no covalentemente a un anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo, que incluyen fragmentos que consisten o que comprenden secuencias CDR. Ejemplos de tipos de marcas que se pueden utilizar en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos

10 fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Aquellos de habilidad ordinaria en la técnica sabrán de otras marcas adecuadas para enlazar a los anticuerpos monoclonales de la invención, o serán capaces de averiguar de tal clase,

15 utilizando la experimentación de rutina. Además, el enlace de estas marcas a los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden hacer utilizando técnicas estándares comunes para aquellos de habilidad ordinaria en el arte.

En algunas modalidades, un anticuerpo CD47 de esta

20 invención se une a una nanopartícula, por ejemplo para el uso en la formación de imagen. Las nanopartículas útiles son aquellas conocidas en la técnica, por ejemplo, que incluyen sin limitación, nanopartícula de Raman-sílice-oro (R-Si-Au-NP). La R-Si-Au-NPs consisten de la molécula orgánica de

25 Raman, con una firma espectral de banda reducida, adsorbida

sobre un núcleo de oro. Debido a que la molécula orgánica de Raman se puede cambiar, cada nanopartícula puede llevar su propia firma, para de esta manera permitir que múltiples nanopartículas sean detectadas de manera independiente simultáneamente por la multiplexación. La nanopartícula completa es encapsulada en una cubierta de sílice para mantener la molécula orgánica de Raman sobre el nanonúcleo de oro. La (PEG)-ilación de polietilenglicol opcional de R-Si-Au-NPs incrementa su biodisponibilidad y proporciona "mangos" funcionales para unir las porciones de dirección. Ver, por ejemplo, Thakor y colaboradores (2011), *Sci. Transl. Med.*, 3(79):79ra33; Jokerst y colaboradores (2011) *Small.*, 7(5):625-33; Gao y colaboradores (2011) *Biomaterials*, 32(8):2141-8.

Para propósitos de la invención, CD47 se puede detectar por los anticuerpos CD47 de esta invención cuando se presenta en fluidos biológicos y en tejidos, in vivo o in vitro. Cualquier muestra que contiene una cantidad detectable de CD47 se puede utilizar. Una muestra puede ser un líquido tal como orina, saliva, fluido cerebroespinal, sangre, suero y los similares, o un sólido o semisólido tales como tejidos, heces y los similares o alternativamente, un tejido sólido tal como aquellos comúnmente utilizados en la diagnosis histológica.

Otra técnica de marcación que puede dar por

resultado mayor sensibilidad consiste de acoplar los anticuerpos a haptenos de bajo peso molecular. Estos haptenos luego pueden ser específicamente detectados por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, es común utilizar haptenos tal
5 como biotina, que reacciona con avidina, o dinitrofenol, piridoxal o fluoresceína, que puede reaccionar con anticuerpos anti-hapteno específicos.

Como una materia de conveniencia, un anticuerpo CD47 de esta invención se puede proporcionar en un kit, es
10 decir, en una combinación empaquetada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Donde el anticuerpo es marcado con una enzima, el kit incluirá substratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de substrato que
15 proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, otros aditivos pueden ser incluidos tales como estabilizadores, amortiguadores (por ejemplo, un amortiguador de bloqueo o amortiguador de lisis) y los similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos se puede
20 variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución en los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos se pueden proporcionar como polvos secos, usualmente liofilizados, que incluyen excipientes que en disolución
25 proporcionarán una solución de reactivo que tiene la

concentración apropiada.

Las formulaciones terapéuticas que comprenden uno o más anticuerpos de la invención se preparan para el almacenamiento al mezclar el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables, opcionales (ver por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ava edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. La composición de anticuerpo será formulada, dosificada y administrada en un aspecto consistente con la buena práctica médica. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que es tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la programación de administración y otros factores conocidos para los profesionales médicos. La "cantidad terapéuticamente efectiva" del anticuerpo que es administrado será gobernada por tales consideraciones, y la cantidad mínima necesaria para prevenir la enfermedad asociada con CD47.

La dosis terapéutica puede ser por lo menos aproximadamente 0.01 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, por lo menos aproximadamente 0.05 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal; por lo menos aproximadamente 0.1 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, por lo menos aproximadamente 0.5 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, por lo menos

aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, por lo menos
aproximadamente 2.5 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, por lo menos
aproximadamente 5 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, y no más de
aproximadamente 100 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal. Será entendido
5 por uno de habilidad en la técnica que tales guías serán
ajustadas para el peso molecular del agente activo, por
ejemplo, en el uso de fragmentos de anticuerpo, o en el uso
de conjugados de anticuerpo. La dosificación también se puede
variar para administración localizada, por ejemplo
10 intranasal, inhalación, etc., o para administración
sistémica, por ejemplo, intraperitoneal (I.P.), intravenosa
(I.V.), intradérmica (I.D.), intramuscular (I.M.) y los
similares.

Un anticuerpo CD47 de esta invención no necesita
15 ser, pero opcionalmente se formula con uno o más agentes que
potencializan la actividad, o que de otra manera incrementan
el efecto terapéutico. Estos generalmente se utilizan en las
mismas dosificaciones y con rutas de administración como se
utilizan anteriormente en la presente o aproximadamente de 1
20 a 99% de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

Los portadores, excipientes o estabilizadores
aceptables son no tóxicos a los recibidores en las
dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen
amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos
25 orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y

metionina; conservadores (tal como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tal como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menor que aproximadamente 10 residuos); proteínas, tal como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sal tal como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN^{MR}, PLURONICS^{MR} o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones que se utilizan para administración in vivo deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Los ingredientes activos que contienen anticuerpos CD47 también se pueden atrapar en microcápsula preparada, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de

poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Un anticuerpo CD47 o composición farmacéutica de esta invención se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, que incluye parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo anti-CD47 se administra adecuadamente mediante infusión pulsada, particularmente con dosis declinantes del anticuerpo.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad que es tratada, como es definido en lo anterior, la severidad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para propósitos preventivos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta de anticuerpo, y el buen juicio del médico asistente. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos.

En otra modalidad de la invención, se proporciona

un artículo de manufactura que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos en lo anterior. El artículo de manufactura comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales tal como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es efectiva para tratar la condición y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el anticuerpo anti-CD47. La marca sobre, o asociada con, el recipiente indica que la composición se utiliza para tratar la condición de elección. El artículo de manufactura además puede comprender un segundo recipiente que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Éste además puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y por el usuario, que incluye otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e inserciones de paquete con instrucciones para uso.

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a aquellos de habilidad ordinaria en la técnica

con una divulgación y descripción completa de cómo hacer y utilizar la presente invención, y no se proponen para limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni se propone para representar que los experimentos
5 enseguida son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.) pero algunos errores y desviaciones experimentales deben ser tomados en cuenta. A menos que se
10 indique de otra manera, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión está en o cerca de la atmosférica.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente
15 citadas en esta especificación se incorporan en la presente por referencia como si cada publicación individual o solicitud de patente fuera específicamente e individualmente indicada que es incorporada por referencia.

La presente invención se ha descrito en términos de
20 modalidades particulares encontradas o propuestas por el presente inventor para comprender modos preferidos para la práctica de la invención. Será apreciado por aquellos de habilidad en la técnica que, en vista de la presente descripción, numerosas modificaciones y cambios se pueden
25 hacer en las modalidades particulares ejemplificadas sin

apartarse del alcance propuesto de la invención. Por ejemplo, debido a la redundancia de codón, se pueden hacer cambios en la secuencia de ADN implícita sin afectar la secuencia de proteína. Por otra parte, debido a las consideraciones de equivalencia funcional biológica, se puede hacer cambios en la estructura de proteína sin afectar la acción biológica en la clase o cantidad. Todas de tales modificaciones se proponen para ser incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10 **Establecimiento de la Biblioteca de Fago**

CD47 es un receptor de membrana de 50 kDa que tiene el dominio IgV N-terminal extracelular, cinco dominios de transmembrana y una cola intracelular C-terminal corta. La proteína de dominio CD47-IgV humana conjugada con Fc humana o la proteína de dominio CD47-IgV humana biotinilada (ACROBiosystems) se utilizó como el antígeno para la captación de biblioteca de fago.

La biblioteca de fago se construyó utilizando vectores de fagémido que consistieron de los fragmentos de gen de anticuerpo que se amplificaron de los bazo o médulas óseas de >50 sujetos humanos saludables. El formato de anticuerpo es el fragmento variable de una sola cadena (VH + enlazador + VL). El tamaño de biblioteca fue 1.1×10^{10} y la diversidad de secuencia se analizó como sigue. Para los 62 clones recolectados de la biblioteca y además secuenciados,

16 secuencias que tienen truncamiento, desplazamiento de estructura o codón ámbar; 46 secuencias que tienen scFv de longitud completa de las cuales todas las secuencias HCDR3 son únicas. En los 46 scFv de longitud completa, 13
5 secuencias tienen cadena ligera lambda y 33 secuencias tienen cadena ligera kappa.

Captación de Fago y Selección del Clon

Para obtener los clones de fago que específicamente enlazan al dominio CD47-IgV humano, se utilizaron dos métodos
10 para la captación de fago.

1. Captación con inmunotubo de la biblioteca de fago contra CD47-IgV humana

En este método, las bibliotecas de fago desarrolladas como es describió en lo anterior primero se
15 incubaron en inmunotubo recubierto con caseína durante 2 horas. La proteína de fusión CD47-IgV-Fc humana se utilizó para la primera ronda de captación. Los fagos no enlazados se removieron al lavar con PBST durante 5-20 veces. Los fagos enlazados se eluyeron con solución de Trietilamina 100 mM
20 recientemente preparada y se neutralizaron mediante la adición de un amortiguador Tris-HCl, para llegar a ser las primeras acumulaciones del fago de salida. Esta primera acumulación de fago de salida se rescató a través de la infección de células TG-1 de *E. Coli* para amplificación,
25 seguido por la segunda ronda de captación utilizando CD47-IgV

humana biotinilada como antígeno. Los fagos enlazados se eluyeron en el mismo proceso y llegaron a ser la segunda acumulación de fago de salida que luego se rescató y luego nuevamente se siguió por la tercera ronda de captación utilizando la proteína de fusión CD47-IgV-Fc humana como antígeno. Los fagos enlazados luego llegaron a ser la tercera acumulación de fago de salida y se sometieron a la cuarta ronda de captación utilizando CD47-IgV humana biotinilada.

2. Captación de solución de biblioteca de fago contra CD47-IgV humana

En este segundo método, las bibliotecas de fago primero se incubaron y se colocaron en cuentas magnéticas de estreptavidina de 100 μ L bloqueadas con caseína para agotar los enlazadores de cuentas de estreptavidina. Las cuentas magnéticas de estreptavidina y AG0084-huIgG1/k se utilizaron para el agotamiento negativo. La biblioteca agotada se rescató, la cual fue seguida por la segunda ronda de captación utilizando CD47-IgV humana biotinilada como antígenos y además se sometió al agotamiento negativo con cuentas magnéticas de estreptavidina bloqueadas con caseína. Los fagos no enlazados se removieron mediante lavado con PBST durante 5-20 veces. Los fagos enlazados se eluyeron con una solución de Trietilamina 100 mM recientemente preparada, se neutralizaron mediante la adición del amortiguador Tris-HCl, y luego se rescataron, lo cual fue seguido por la tercera

ronda de captación utilizando la proteína de fusión CD47-IgV-Fc humana y se agotó con AG0084-huIgG1/k. Los fagos enlazados luego llegaron a ser la tercera acumulación de fago de salida y se sometieron a la cuarta ronda de captación utilizando
5 CD47-IgV humana biotinilada y el agotamiento negativo con las cuentas magnéticas de estreptavidina bloqueadas con caseína.

Después de este proceso, múltiples clones de fago que específicamente enlazaron al dominio CD47-IgV humano se obtuvieron y se enriquecieron. Ellos luego se diluyeron y se
10 colocaron en placa para el crecimiento a 37°C durante 8 horas y se capturaron por el filtro recubierto de anticuerpo anti-kappa durante la noche. CD47-IgV humana biotinilada (50 nM) y el conjugado NeutrAvidin-AP (dilución 1:1000) se aplicaron al filtro para detectar los clones de fago positivamente
15 enlazados. Las placas de fago positivas se recolectaron y se eluyeron en 100 µL de amortiguador de elución de fago. Aproximadamente 10-15 µL de fagos eluidos se utilizaron para infectar 1 mL de células azules XL1 para ser el fago de título alto (HT) para ELISA de un solo punto de fago (SPE).
20 Los clones individuales positivos recolectados del filtro luego se sometieron al enlace de la proteína de fusión CD47-IgV-Fc humana y la proteína del dominio CD47-IgV humana biotinilada. Estos clones individuales positivos también se secuenciaron para sus genes VH y VL. Todos los aciertos
25 positivos con genes VH y VL únicos se clonaron en los

vectores de expresión pFUSE2ss-CLIg-hk (cadena ligera, InvivoGen, Cat No. pfuse2ss-hclk) y pFUSEss-CHIg-hG1 (cadena pesada, InvivoGen, Cat No. pfuse2ss-hchg1). Los anticuerpos se expresaron en células HEK293 y se purificaron mediante
5 Agarosa de Proteína A Plus.

Maduración por afinidad de anticuerpos CD-47

La afinidad de enlace de los anticuerpos CD-47 de esta invención se puede mejorar mediante la maduración por afinidad *in vitro*, por ejemplo, mediante la mutación
10 aleatorizada específica del sitio, que dio por resultado secuencias mutadas que también están dentro del alcance de esta invención.

Por ejemplo, el análisis BiaCore de 1F8, un anticuerpo CD47 de esta invención, mostró una afinidad de
15 enlace (KD) de 2.8 nM con una alta velocidad de disociación de 1.04×10^{-3} 1/s, que se podría mejorar mediante la maduración por afinidad *in vitro*. Un análisis extensivo de la secuencia CDR de la cadena pesada y la cadena ligera de 1F8 identificó varios residuos en las regiones HCDR1 y LCDR1 que podrían ser
20 aleatorizados por mutación. Por lo tanto, las bibliotecas de mutagénesis aleatorias se pueden construir e introducir en los residuos específicos para generar una variedad de nuevas secuencias. Las bibliotecas de mutagénesis CDR se capturaron utilizando CD47 ECD soluble biotinilado en fase de solución
25 bajo la condición de equilibrio. Después de múltiples rondas

de captación con la concentración de antígeno reducida, los aglutinantes de salida enriquecidos se seleccionaron para la prueba de ELISA de enlace y subsecuentemente se convirtieron en IgG completos que se sometieron al análisis BiaCore para
5 seleccionar específicamente la secuencia mejorada fuera de la tasa. A través de este proceso de clasificación, las moléculas de anticuerpo de esta invención se pueden construir para mejores propiedades totales para aplicaciones clínicas.

**Ejemplo 1. Clasificación por ELISA de clones de fago que
10 enlazan a la proteína CD47-ECD recombinante**

La proteína de fusión CD47-Fc humana recombinante (Acrobiosystems) se recubrió en 2 µg/mL en solución salina amortiguadora de fosfato (PBS) sobre placas de microtítulo durante 2 horas a la temperatura ambiente (RT). Después del
15 recubrimiento del antígeno, las cavidades se bloquearon con PBS/Tween al 0.05% (PBST) con BSA al 1% durante 1 hora a la temperatura ambiente (RT). Después del lavado de las cavidades con PBST, los fagos purificados de las colonias individuales se adicionaron a las cavidades y se incubaron
20 durante 1 hora a RT. Para la detección de los clones de fago de enlace, los anticuerpos secundarios conjugados con HRP contra M13 (Jackson Immuno Research) se adicionaron, seguido por la adición de substratos fluorogénicos (Roche). Entre todas las etapas de incubación, las cavidades de la placa se
25 lavaron con PBST tres veces. La fluorescencia se midió en un

lector de placa TECAN Spectrafluor. Los clones de fago positivos se seleccionaron para la secuenciación de los genes de cadena pesada y cadena ligera.

Todos los anticuerpos CD47 probados de esta invención muestran buenas actividades de enlace para la proteína de fusión CD47-Fc humana recombinante.

Ejemplo 2. Análisis por ELISA de anticuerpos que bloquean la interacción de CD47 a SIRP α

La proteína de fusión CD47 humana/Fc de ratón humana recombinante de la proteína CD47 biotinilada (Acrobiosystems) se recubrió en 1 μ g/mL en PBS sobre placas de microtítulo durante 2 horas a RT. Después del recubrimiento del antígeno las cavidades se bloquearon con PBS/Tween al 0.05% (PBST) con BSA al 1% durante 1 hora a RT. Después del lavado de las cavidades con PBST, los anticuerpos diluidos en PBS se adicionaron a las cavidades (5 μ g/mL) y se incubaron durante 1 hora a RT. Para la detección de los anticuerpos de enlace, los anticuerpos secundarios conjugados con HRP contra Fc humana (Jackson Immuno Research) se adicionaron, seguido por la adición de substratos fluorogénicos (Roche). Entre todas las etapas de incubación, las cavidades de las placas se lavaron con PBST tres veces. La fluorescencia se midió en un lector de placa TECAN Spectrafluor.

Todos los anticuerpos CD47 probados de esta

invención mostraron buenas actividades de enlace para la proteína de fusión CD47-Fc humana recombinante y la proteína CD47 biotinilada.

Ejemplo 3. Análisis por ELISA de los anticuerpos que bloquean

5 la interacción de CD47 a SIRP α

La proteína de fusión CD47-Fc recombinante (Acrobiosystems) se recubrió en 1 μ g/mL en PBS sobre placas de microtítulo durante 16 horas a 4°C. Después del bloqueo durante 1 hora con BSA al 1% en PBST a RT, 1 μ g/ml de
10 proteína SIRP α -His se adicionó ya sea en la ausencia o en presencia de anticuerpos CD47 (10 μ g/mL) a RT durante 1 hora. Las placas se lavaron subsecuentemente tres veces y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-His conjugado con HRP durante 1 hora a RT. Después del lavado, la solución de
15 TMB se adicionó a cada cavidad durante 30 minutos y la reacción se detuvo con H₂SO₄ 2.0 M, y la OD se midió a 490 nm.

Todos los anticuerpos CD47 probados de esta invención efectivamente bloquearon el enlace de la proteína CD47-SIRP α .

20 Ejemplo 4. Respuesta dependiente de dosis de anticuerpos CD47 que enlazan a CD47-ECD monomérico

Después del enlace directo y la clasificación por competición, un anticuerpo CD47 de esta invención 1F8 se seleccionó para esta prueba, en comparación con dos
25 anticuerpos de referencia existentes. La proteína CD47

biotinilada (Acrobiosystems) se recubrió en 1 µg/mL en PBS sobre placas de microtítulo durante 2 horas a RT. Después del recubrimiento del antígeno, las cavidades se bloquearon con PBS/Tween al 0.05% (PBST) con BSA al 1% durante 1 hora a RT.

5 Después del lavado de las cavidades con PBST, diferentes concentraciones de anticuerpos CD47 se adicionaron a la cavidad y se incubaron durante 1 hora a RT. Para la detección de los anticuerpos de enlace, los anticuerpos secundarios conjugados con HRP contra Fc humana (Jackson Immuno Research)
10 se adicionaron seguido por la adición de substratos fluorogénicos (Roche). Entre todas las etapas de incubación, las cavidades de las placas se lavaron con PBST tres veces. La fluorescencia se midió en un lector de placa TECAN Spectrafluor.

15 Los anticuerpos de referencia 5F9 y 2A1 se produjeron de acuerdo con la secuencia de Hu5F9 y CC-90002 como es descrito por los investigadores en la Universidad de Stanford, Inhibrx LLC, y Celgene Corp. (ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 9,017,675 B2, Patente de
20 los Estados Unidos No. 9,382,320. Patente de los Estados Unidos No. 9,221,908, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2014/0140989 y WO 2016/109415) y se utilizaron para el mismo estudio.

Como se muestra en la Fig. 1, todos los tres
25 anticuerpos (1F8, 5F9 y 2A1) mostraron actividades de enlace

similares a CD47-ECD monomérica.

Ejemplo 5. Respuesta dependiente de dosis de anticuerpos CD47 que enlazan a CD47-ECD dimérico

Los tres anticuerpos CD47 utilizados en el Ejemplo
5 4 (es decir, 1F8, 5F9 y 2A1) también se utilizaron en este estudio.

La proteína de fusión de CD47/Fc de ratón (Acrobiosystems) se recubrió en 1 µg/ml en PBS sobre placas de microtítulo durante 2 horas a RT. Después del
10 recubrimiento del antígeno las cavidades se bloquearon con PBS/Tween al 0.05% (PBST) con BSA al 1% durante 1 hora a RT. Después del lavado de las cavidades con PBST, concentraciones diferentes de los anticuerpos anti-CD47 se adicionaron a la cavidad y se incubaron durante 1 hora a RT. Para la detección
15 de los anticuerpos de enlace, los anticuerpos secundarios conjugados con HRP contra Fc humana (Jackson Immuno Research) se adicionaron seguido por la adición de substratos fluorogénicos (Roche). Entre todas las etapas de incubación, las placas de las cavidades se lavaron con PBST tres veces.
20 La fluorescencia se midió en un lector de placa TECAN Spectrafluor.

Del mismo modo, como se muestra en la Fig. 2a, entre los tres anticuerpos probados 1F8, 5F9 y 2A1, todos ellos mostraron actividades de enlace similares a CD47-ECD
25 dimérico.

Otro estudio de enlace se condujo para comparar la afinidad de enlace de dos anticuerpos de esta invención, es decir, 1F8 y 13H3, a CD49-ECD recombinante. Como se muestra en la Fig. 2b, estos dos anticuerpos también exhibieron actividades de enlace similares de una manera dependiente de dosis, con EC_{50} que es 0.038 nM para 1F8 y 0.045 nM para 13H3.

Ejemplo 6. Respuesta dependiente de dosis de anticuerpos CD47 que bloquean el enlace de CD47 a SIRP α

Tres anticuerpos CD47 (es decir, 1F8, 5F9 y 2A1) también se utilizaron en este estudio.

La proteína de fusión CD47-Fc recombinante (Acrobiosystems) se recubrió en 1 μ g/ml en PBS sobre placas de microtítulo durante 16 horas a 4°C. Después del bloqueo durante 1 h con BSA al 1% en PBST a RT, 1 μ g/mL de proteína SIRP α -His se adicionó ya sea en la ausencia o presencia de diferentes concentraciones de anticuerpos anti-CD47 a RT durante 1 h. Las placas se lavaron subsecuentemente tres veces y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-His conjugado con HRP durante 1 h a RT. Después del lavado, la solución de TMB se adicionó a cada cavidad durante 30 minutos y la reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 M y la OD se midió a 490 nm.

Nuevamente, como se muestra en la Fig. 3a, todos los tres anticuerpos mostraron actividades similares en bloquear el enlace de CD47 a SIRP α .

Otro estudio se condujo para comparar la habilidad de los dos anticuerpos CD47 de esta invención 1F8 y 13H3 para bloquear el enlace de CD47 a SIRP α . Como se muestra en la Fig. 3b y Fig. 3c, estos dos anticuerpos también exhibieron actividades de bloqueo similares de una manera dependiente de dosis, con IC₅₀ que es 0.78 nM para 1F8 y 0.20 nM para 13H3.

Ejemplo 7. Respuesta dependiente de dosis de anticuerpos CD47 que enlazan a células Raji CD47⁺

Tres anticuerpos CD47 (es decir, 1F8, 5F9 y 2A1) también se probaron en este estudio.

Las células Raji que expresan endógenamente CD47 humana sobre la superficie se mancharon con diferentes concentraciones de los anticuerpos 1F8, 5F9 y 2A1 a 4°C durante 30 minutos. Luego, las células se lavaron con PBS tres veces, seguido por la incubación con el anticuerpo específico de Fc anti-humano marcado con APC (Invitrogen) a 4°C durante 30 minutos. El enlace se midió utilizando un FACSCanto (Becton-Dickinson).

Como se muestra en la Fig. 4a, todos los tres anticuerpos mostraron actividades similares en el enlace a las células Raji CD47⁺, siguiendo el mismo patrón dependiente de dosis.

Otro estudio se condujo para comparar la habilidad de los dos anticuerpos CD47 de esta invención 1F8 y 13H3 para enlazar a las células Raji que llevan CD47. Como se muestra

en la Fig. 4b, 13H3 exhibió la afinidad más fuerte que 1F8 en el enlace de las células Raji que llevan CD47, con EC_{50} que es 2.95 nM para 1F8 y 1.06 nM para 13H3.

La Fig. 4c y Fig. 4d muestran la cinética de enlace de 1F8 y 13H3, respectivamente, como se mide por el análisis Biocore; y la Fig. 4e muestra los datos.

Ejemplo 8. Estudio de fagocitosis de células de tumor por el macrófago humano (MΦ)

Tres anticuerpos CD47 (es decir, 1F8, 5F9 y 2A1) también se utilizaron en este estudio.

Las PBMCs se aislaron de la sangre humana, y los monocitos se diferenciaron en macrófagos durante 6 días. Los macrófagos derivados de monocitos (MDMs) se rasparon y se colocaron en placas de 24 cavidades y se dejaron adherir durante 24 horas. La línea celular de tumor humano Raji que expresó endógenamente CD47 se eligió como células objetivo y se marcaron con 1 μ M CFSE durante 10 minutos, luego se adicionó a la MDMs en una relación de 5:1 de células de tumor por fagocito y los anticuerpos CD47 se adicionaron en varias dosis. Después de la incubación durante 3 horas, las células objetivo no fagocitosadas se deslavarón con PBS y los fagocitos restantes se rasparon, se mancharon con el anticuerpo CD14 de marcador de macrófago, y se analizaron mediante citometría de flujo. La fagocitosis se midió al confinar en células CD14⁺ y luego al estimar el por ciento de

células CFSE⁺.

Como se muestra en la Fig. 5a, todos estos tres anticuerpos probados (es decir, 1F8, 5F9 y 2A1) mostraron actividades similares en promover la fagocitosis de células de tumor por MΦ humano. Las figs. 6a, 6b y 6c muestran la fagocitosis mediada por macrófago de tres líneas celulares de cáncer de sangre humana diferentes, activadas por los tres anticuerpos CD47.

Otro estudio se condujo para comparar la habilidad de dos anticuerpos CD47 de esta invención 1F8 y 13H3 para promover la fagocitosis de células de tumor por MΦ humana. Como se muestra en la Fig. 5b, 13H3 y 1F8 exhibieron habilidad similares con 13H3 con fagocitosis ligeramente más fuerte en algunas concentraciones.

Ejemplo 9. Propiedad de Modulación de RBC en el Ensayo de Aglutinación de RBC

Las RBCs humanas se diluyeron a 10% en PBS y se incubaron a 37°C durante 2 horas con la titulación de anticuerpos CD47 en una placa de 96 cavidades de fondo redondo. La evidencia de hemaglutinación se demuestra por la presencia de RBCs no aceptadas, que aparecen como una turbiedad comparada con un punto rojo puntualizado de RBCs no hemaglutinadas (ver las Figs 7a y 8a). Las gráficas en las Figs. 7b y 8b muestran la cuantificación del ensayo de hemaglutinación, denotado "índice de aglutinación"

determinado al cuantificar el área de la pelotilla de RBC en la presencia del anticuerpo, normalizada a aquella del control IgG.

Como se muestra en las Figs. 7a, 7b, 8a y 8b, mientras que el anticuerpo CD47, 5F9 ya mostró aglutinación de RBC significativa a una concentración de o más alta que es 0.1 $\mu\text{g}/\text{uL}$, los anticuerpos CD47, 1F8 y 2A1 dieron por resultado esencialmente nada de aglutinación RBC en las concentraciones probadas hasta 30 $\mu\text{g}/\text{uL}$ (Figs. 7a y 7b) o aún hasta 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figs. 8a y 8b).

Del mismo modo, las Figs. 8c y 8d muestran que los anticuerpos CD47 de esta invención (es decir, 1F8 y 13H3) dieron esencialmente nada de aglutinación de RBC en las concentraciones probadas de hasta 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que el anticuerpo CD47, F947 ya mostró aglutinación de RBC significativa a una concentración de o más alta que 0.1 $\mu\text{g}/\text{uL}$.

Ejemplo 10. Ensayo de Enlace de RBC

El enlace de anticuerpos CD47 contra RBCs humanas se examinó mediante citometría de flujo. Las RBCs humanas se incubaron con anticuerpos CD47 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 4°C durante 1 hora, seguido por la adición del anticuerpo secundario conjugado con APC a 4°C durante 30 minutos.

Como se muestra en las Figs. 9a y 9b, sorprendentemente, el anticuerpo CD47 de esta invención 1F8

no enlazó a RBC mientras que los anticuerpos CD47 de referencia 5F9 y 2A1 lo hicieron en las concentraciones probadas.

Del mismo modo, las Figs. 9c y 9d muestran que
5 mientras que 1F8 no dio por resultado enlace de RBC en las concentraciones probadas, 13H3 únicamente dio por resultado un enlace de RBC muy bajo en las concentraciones probadas.

Ejemplo 11. Ensayo de Aglutinación de RBC

Las RBCs se recolectaron de seis individuos
10 saludables machos y seis individuos saludables hembras para el análisis de la aglutinación de RBC mediante la adición de anticuerpos CD47. Las Figs. 10a y 10b muestran los resultados de titulación en el ensayo de hemaglutinación, que se denota "índice de aglutinación" como se determina al medir el área
15 de las pelotillas RBC en la presencia del anticuerpo, normalizada a aquella del control de IgG o anticuerpo de referencia.

Ejemplo 12. Ensayo de Enlace de Plaqueta

El enlace de los anticuerpos CD47 de esta invención
20 contra plaquetas humanas se examinó mediante citometría de flujo. La sangre entera periférica humana se incubó con los anticuerpos CD47 de prueba de esta invención (a 10 $\mu\text{g/mL}$) o la fusión de SIRP α -Ig y CD61 se manchó como un marcador de superficie para plaquetas. El enlace de anticuerpos CD47 o la
25 fusión SIRP α -Ig se midió al confinar en la población positiva

de CD61 (plaquetas) y al examinar adicionalmente los porcentajes de CD47 o el enlace de la fusión SIRP α -Ig.

Como se muestra en la Fig. 11, los anticuerpos CD47 probados de esta invención no enlazaron apreciablemente las
5 plaquetas humanas mientras que las proteínas SIRP α lo hicieron.

Ejemplo 13. Ensayo de Aglutinación de RBC Mono Cynomolgus

RBCs de mono cynomolgus macho y hembra se diluyeron con 10% en PBS y se incubaron a 37°C durante 2 horas con las
10 concentraciones indicadas de anticuerpos CD47 en una placa de 96 cavidades de fondo redondo. La evidencia de hemaglutinación se demostró por la presencia de RBCs no asentadas, que aparecen como una turbiedad comparada con un punto rojo puntualizado de RBCs no hemaglutinadas, como se
15 muestra en la Fig. 12a. La Fig. 12b muestra los resultados de titulación del ensayo de hemaglutinación, que se denota "índice de aglutinación" como se determina al medir el área de las pelotillas RBC en la presencia del anticuerpo, normalizada a aquella del control IgG.

20 Los datos muestran que los anticuerpos CD47 probados de esta invención no indujeron apreciablemente la aglutinación de RBC de cynomolgus *in vitro*.

Ejemplo 14. Fagocitosis de Células AML Humanas Primarias mediante Anticuerpos CD47

25 Las PBMCs primarias del paciente AML (AML-PB003F)

se marcaron con 1 μ M de CFSE durante 10 minutos, luego se adicionaron a MDMs en una relación de 5:1 de células de tumor por fagocito y los anticuerpos CD47 indicados se adicionaron en varias concentraciones. Después de la incubación de 3
5 horas, las células objetivo no fagocitosadas se deslavarón con PBS y los fagocitos restantes se rasparón, se mancharon con un anticuerpo CD14 y se analizaron mediante citometría de flujo. La fagocitosis se midió al confinar en células CD14+ y luego al estimar el porcentaje de células CFSE+. La
10 fagocitosis se midió como es mencionado previamente.

Como se muestra en las Figs. 13a-13h, los anticuerpos CD47 probados de esta invención todos mostraron capacidad es de enlace de AML significativas (mayores que 75%) y las capacidades de fagocitosis (por lo menos 36%)
15 todas las cuales son mucho más altas que el anticuerpo CD47 de referencia utilizado en el mismo ensayo.

Ejemplo 15. Eficacia *In Vivo* de 1F8 Utilizando el Modelo de Xenoinjerto de Luciferasa-Raji (CDX)

Los ratones NSG se injertados con Raji Luc-EGFP a
20 una concentración de 1 millón de células/ratón por la vía de la inyección en la vena de la cola. Ellos se formaron en imagen *in vivo* para determinar el nivel de injerto cinco días de post injerto. El tratamiento de anticuerpos CD47 (es decir, 1F8, 5F9 y 2A1) inició desde el mismo día a una dosis
25 de 10 mg/kg. Todos los ratones se inyectaron un día sí y otro

no por la vía de la inyección intraperitoneal. Los ratones se formaron en imagen *in vivo* por la vía del sistema de formación de imagen IVIS Lumina III en los siguientes puntos de tiempo: Día 0 de tratamiento con anticuerpos, Día 2 de
5 tratamiento, Día 6 de tratamiento y Día 9 de tratamiento. El crecimiento de tumor en los ratones se midió mediante el análisis de radiación de bioluminiscencia a través de sistema de formación de imagen vivo en *in vivo*.

Como se puede observar en la Fig. 14a, el análisis
10 de la radiación de bioluminiscencia muestra que los tumores en los ratones escasamente crecieron dentro de los primeros tres días después de los tratamientos con el anticuerpo CD47 probado de esta invención (es decir, 1F8) y los tumores se redujeron desde el día 6 después de los tratamientos. En
15 comparación, los tumores en los ratones tratados con el anticuerpo CD47 de referencia continuaron creciendo durante el mismo período de tratamiento.

De manera similar, la Fig. 14b muestra que el anticuerpo CD47, 13H3 también fue efectivo *in vivo* en el
20 modelo de xenografía de Raji en diferentes concentraciones de prueba.

Al final del estudio de xenoinjerto de Raji, todos los ratones se sacrificaron mediante el uso de CO₂ para la eutanasia de roedor. Los esplenocitos de cuatro grupos de
25 ratones se aislaron y se analizaron para el porcentaje de

macrófagos **M1**, (% de CD80 positivo en macrófagos positivos de F4/80) y macrófagos **M2** (% de CD206 positivo en macrófagos positivos de F4/80) mediante el análisis de citometría de flujo.

5 Como se muestra en las Figs. 15a-15b, todos los anticuerpos CD47 probados (incluyendo 1F8) fueron capaces de inducir la polarización del macrófago en ratones que llevan tumor.

Ejemplo 16. Perfil de expresión de CD47 utilizando muestras
10 **de PDX de varios tipos de cáncer humano**

54 muestras PDX (a través de 7 tipos de cáncer humano) se analizaron para la expresión de CD47 mediante el manchado con inmuno-histoquímica. Los niveles de manchado de CD47 en varias muestras PDX se registraron mediante geometría
15 e intensidad de manchado. Las Figs. 16a, 16b y 16c muestran los diferentes niveles de expresión de CD47 después de los tratamientos con anticuerpos CD47.

Ejemplo 17. Estudio de Safety Pharma (estudios de PK de Cynomolgus in vivo)

20 Los monos cynomolgus naïve se infundieron intravenosamente con vehículo (n=2), 1F8 (n=3, 15 mg/kg) y 5F9 (n=3, 15 mg/kg). La hematología (CBC) se analizó dentro de 24 horas después de la colección de la sangre, dos veces antes de las inyecciones y en 3, 6, 10, 14 y 21 días después
25 de la administración del anticuerpo. Los parámetros CBC se

examinaron utilizando el conteo de Eritrocitos (RBC), Hemoglobina (HGB), Reticulocitos Absolutos y Conteos de Plaquetas. Los resultados se representan en las Figs. 17a-17d y mostraron que los tratamientos con 1F8 no afectaron los parámetros de hematología en el mono cynomolgus.

De manera similar, los monos cynomolgus naïve (n=2) se inyectaron intravenosamente con el anticuerpo CD47, 13H3 a una dosis de 20 mg/kg. Su sangre se recolectó mediante venipunción en tubos sin anticoagulante en diferentes puntos de tiempo. El nivel en suero del anticuerpo CD47, 13H3 se midió mediante ELISA utilizando la proteína CD47 como el reactivo de recubrimiento, seguido por la detección con un anticuerpo secundario anti-Kappa humano conjugado con HRP. Los parámetros farmacocinéticos en mono cynomolgus se analizaron por Winolin y se muestran en la Fig. 17e y la siguiente tabla.

$T_{1/2}$ (h)	C_{max} (Hg/ml)	AUC_{0-t} (día*µg/ml)	AUC_{inf} (día*µg/ml)	CL (ml/hr/kg)
145.2±10.8	536.4±63.9	10692.1±1300.9	10712.5±1298.4	1.880±0.228

Estudio de Safety Pharm (Hematología) del Anticuerpo 13H3 en Mono Cynomolgus

Los monos cynomolgus naïve se infundieron intravenosamente con una sola dosis o dosis repetidas (dosificación semanal) del anticuerpo 13H3 (20 mg/kg). Los

parámetros de hematología (CBC) se examinaron que incluyen el conteo de Eritrocitos (RBC), Hemoglobina (HGB), Conteos de Plaquetas y Conteos de Linfocitos en los puntos de tiempo indicados después de la administración del anticuerpo.

5 Las Figs. 19a, 19b, 19c, 19d, 19e, 19f, 19g y 19h muestran los efectos del anticuerpo CD47, 13H3 en la congregación de RBC, hemoglobina, plaquetas y linfocitos.

Ejemplo 18. Estructura del Anticuerpo 1F8

El escrutinio del epítipo de anticuerpos CD47 se
10 estimó mediante ELISA de competición. La proteína CD47 ECD y el primer anticuerpo anti-CD47 se pre-incubaron y se adicionaron a un segundo anticuerpo anti-CD47 biotinilado detectado por el anticuerpo de HPR de Estreptavidina. Si el primer anticuerpo anti-CD47 competió contra el de CD47 ECD al
15 segundo anticuerpo, ambos anticuerpos se colocaron en los mismos o sobrepuestos cajones de epítipo. Si no es así, ellos se colocaron en cajones de epítipo no sobrepuestos. Los resultados representados en las Figs. 18a y 18b muestran que el anticuerpo CD47 de esta invención 1F8 tiene un diferente
20 epítipo que aquellos de los anticuerpos de referencia 5F9 y 2A1.

La Fig. 18c muestra la estructura de cristal de Ab 5F9 de referencia (parte superior) en el complejo con CD47-ECD humana (verde) como se reporta en la literatura (Ver, por
25 ejemplo, *J. Clin. Investigation*, 126, 7:2610-2620).

La Fig. 18d muestra la estructura de cristal de 1F8-Fab (parte superior) en el complejo con CD47-ECD humana (verde). La estructura compleja de CD47-1F8 Fab adopta la orientación de cabeza a cabeza más recta, distinto a las

5 estructuras complejas de CD47-SIRP α y el diacuerpo CD47-5F9 que representa la orientación de cabeza a cabeza inclinada. El epítipo 1F8 en CD47 es discontinuo y extensivo que incluye los residuos L3, V25, T26, N27, M28, E29, A30, Q31, T34, E35, Y37, A53, L54, L74, K75, G76, T99, E100, L101, T102 y R103,

10 de los cuales L3, N27, E29, Q31, T34, E35, Y37, A53, T99, E100, L101, T102 y R103 están involucrados en las interacciones con SIRP α , que explican las propiedades antagonísticas de 1F8. La estructura compleja también revela el dominio VH de las formas 1F8 de 8 enlaces de hidrógeno y 4

15 puentes de sal de CD47 y el dominio VL de 1F8 forma 8 enlaces de hidrógeno a CD47 también.

Distinto a las estructuras complejas CD47-IgV/anticuerpo o complejo SIRP α publicadas, el anticuerpo 1F8 enlaza epítipos principalmente diferentes del objetivo aunque

20 todos están enlazados en la similar orientación de cabeza a cabeza. El epítipo 1F8 en CD47 es conformacionalmente discontinuo e incluye un bucle TNMEAQ (residuos 26-31), T34, E35, L74 y una bisagra LTR (residuos 101-103) de CD47. Muchas interacciones de enlace de hidrógeno se forman entre las

25 cadenas laterales de los residuos de anticuerpo y los átomos

de oxígeno de la cadena principal de CD47. Un puente de sal también se forma entre R103 de 1F8 y E35 de CD47. Varios contactos de Van der Waals también se observan que son críticos para mantener la orientación apropiada. El dominio

5 VH del anticuerpo 1F8 se involucra principalmente en enlazar al T34, E35 y la bisagra LTR (residuos 101-103) de CD47, mientras que el dominio VK interactúa con el bucle TNMEAQ (residuos 26-31) y L74. Estos epítomos en CD47 son diferentes de aquellos en el anticuerpo 5F9 y SIRPa. El análisis

10 estructural sugiere que dos bucles largos (residuos 26-38 y 52-59) del anticuerpo 1F8 ayudan a enlazar a CD47 en una orientación casi vertical que puede conducir al anticuerpo que es separado de tal manera que CD47 en las células adyacentes no podrían ser puenteadas por el anticuerpo, para

15 de esta manera prevenir la mayoría de la hemaglutinación de células de sangre.

La Fig. 188 muestra la comparación de la interacción de 5F9 y 1F8 con CD47.

La superposición de la estructura compleja 5F9/CD47

20 del anticuerpo de referencia en la estructura compleja de 1F8/CD47 revela que la orientación de enlace de CD47 es muy diferente entre estos dos complejos. Aunque ambos anticuerpos tienen orientación de enlace de cabeza a cabeza, CD47 es girado horizontalmente por aproximadamente 180 grados. La

25 estructura del complejo 1F8/CD47 tiene piroglutamato N-

terminal CD47 cerca del bucle de cadena ligera en los residuos 61-64, mientras que 5F9 tiene el N-terminal CD47 entre 3 bucles de cadena pesada de W52, N32 y W101. En el anticuerpo 1F8, los residuos de cadena pesada Trp33 y Arg103
5 forman el contacto de van der Waals y un puente de sal con Leu101 y Glu35 de CD47, respectivamente. En la misma posición, el residuo 5F9 de anticuerpo con punto de Tyr101 hacia el N-terminal de CD47 a través de un contacto de van der Waals y Arg102 forma un enlace de hidrógeno con Glu104 de
10 CD47. Los residuos del bucle de 1F8 del anticuerpo Asn31, Trp33 y los residuos de bisagra Arg53 y Asp56 forman la red de enlace de hidrógeno inter-dominio, luego Asn31 y Arg53 forman enlaces de hidrógeno con la cadena principal de Leu101 y Thr34 en CD47. En la misma zona interfacial, 5F9 no se
15 muestra para hacer interacción, excepto que el residuo Tyr 52 forma un contacto de van der Waals con Leu3 en CD47. La bisagra (residuo 52-56) es 3 residuos más cortos que aquel de 1F8 (residuos 52-59). En la cadena ligera, tanto Fab 1F8 y 5F9 tienen varias interacciones de enlace de hidrógeno
20 importantes con CD47 del bucle (V29-Y38 en 1F8 y V152-Y158 en 5F9). Los residuos Y97 y Y98 en 1F8 "empujan" el bucle (residuos 26-38) alejados, y éstos últimos formaron 2 enlaces de hidrógeno entre 1F8 y CD47, específicamente entre Arg34 de 1F8 y la cadena principal de Leu74 en CD47, y entre Arg36 de
25 1F8 y la cadena principal de Thr26 en CD47. Sin embargo, los

residuos de 5F9, Gly218 y Ser219 (que corresponden a Tyr97 y Tyr98 en 1F8) causan que el bucle (residuos 149-158) en 5F9 forme 3 enlaces de hidrógeno con CD47 (en Asn157-Lys39, Tyr159-Glu104 y Lys177-Thr99). También similar a aquel en la
5 cadena pesada, el bucle (residuos 149-158) en 5F9 es aproximadamente 3 residuos más corto que aquel en 1F8 (residuos 26-38). Estos bucles relativamente más largos en 1F8 principalmente contribuyen a la orientación de enlace de CD47.

10 **Ejemplo 19. Anticuerpo CD47, 34C5**

Para generar anticuerpos CD47 anti-humanos, diferentes razas de ratones de 6-8 semanas que incluyen ratones BALB/C, C57/BL6 o SJL se inmunizaron con la proteína de dominio extracelular CD47 humana recombinante por varias
15 rondas. Después de la inmunización, los ratones con suficientes títulos de IgG anti-CD47 se reforzaron con el mismo antígeno seguido por fusión. Los sobrenadantes de hibridoma se probaron para el enlace directo con la proteína CD47 ECD humana y la competición del enlace de SIRP α a CD47
20 mediante clasificación de ELISA. A través de una serie de ensayos de clasificación, 34C5 se seleccionó para humanización y además la caracterización in vitro de acuerdo con los ensayos descritos en lo anterior.

La Fig. 20 y la Fig. 21 muestran la fuerte afinidad
25 de enlace de 34C5 a CD47-ECD recombinante (con una EC₅₀ de

0.27 nM) y a las células Raji que llevan CD47 (con una EC_{50} de 0.83 nM) respectivamente.

La Fig. 22 muestra que 34C5 fue capaz de bloquear efectivamente el enlace de CD47 a SIRP α , con una EC_{50} de 0.30
5 nM.

La Fig. 23 muestra que el anticuerpo 34C5 promovió la fagocitosis de células de tumor por M Φ humana.

La Fig. 24 muestra que el anticuerpo 34C5 no causa aglutinación de RBC *in vitro*.

10 La Fig. 25 muestra que el anticuerpo 34C5 disminuye su enlace a RBC con la concentración disminuida de este anticuerpo.