



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2016/0000671

Recibo: 19-61966

Fecha: 24/07/2019

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

CC: 80.410.337

Pago PSE No: 309850

CUS: 473854253

Patente de Invención Nacional
CONSTRUCCIONES DE VARIANTES DE SIRP-ALFA

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-01	EXAMEN DE PATENTABILIDAD PATENTE DE INVENCION (internet)	1	\$ 1,256,500	\$ 1,256,500
TOTAL					\$ 1,256,500

CONSTRUCCIONES DE VARIANTES DE SIRP-ALFA Y SUS USOS

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La proteína reguladora de señales α (SIRP- α) es una proteína expresada ampliamente sobre la membrana de las células mieloides. La SIRP- α interactúa con CD47, una proteína que es expresada ampliamente sobre muchos tipos celulares en el cuerpo. La interacción de SIRP- α con CD47 impide la endocitosis de células “propias”, que de lo contrario serían reconocidas por el sistema inmunológico. La SIRP- α se descubrió en primer lugar como un ligador de SHP-2 (un dominio SH-2 que contiene tirosina fosfatasa). La CD47 se caracterizó primariamente como un antígeno sobreexpresado sobre las células de carcinoma de ovario.

En el 2000, Oldenborg et al mostraron que la administración de glóbulos rojos (RBC) deficientes en CD47 en un modelo de ratón dio como resultado una rápida depuración de los RBC del sistema, lo cual demuestra que la CD47 es una señal “protectora” presente sobre algunos subconjuntos de células “propias”. Posteriormente, se exploró adicionalmente la posible conexión entre la SIRP- α y el cáncer. Se encontró que una gran expresión de la CD47 presente sobre las células tumorales, en la leucemia mieloide aguda (AML) y en varios cánceres de tumores sólidos, actuaba como un factor de pronóstico negativo para la supervivencia. Se han explorado estrategias dirigidas a interrumpir la interacción entre CD47 y SIRP- α , tal como la administración de agentes que enmascaran ya sea la CD47 o la SIRP- α , como potenciales terapias anticáncer.

Sin embargo, al considerar estas estrategias terapéuticas un problema a tener en cuenta es que la SIRP- α se podría unir a la CD47 presente sobre

muchos tipos celulares diferentes en el cuerpo humano. Por lo tanto, existe la necesidad de modificar la SIRP- α para que sólo se una preferencialmente a la CD47 presente sobre las células enfermas o sobre las células de un sitio de la enfermedad.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención abarca construcciones de variantes de la proteína reguladora de señales α (SIRP- α). Las construcciones de las variantes de la SIRP- α incluyen variantes de SIRP- α . En algunas formas de realización, las construcciones de las variantes de la SIRP- α tienen una actividad preferencial en un sitio de enfermedad (por ejemplo, en el sitio de un tumor antes que en un sitio no enfermo). En determinadas formas de realización, las construcciones de las variantes de la SIRP- α tienen una mayor afinidad de unión por la CD47 presente sobre células enfermas (por ejemplo, células tumorales). En algunas formas de realización, las variantes de SIRP- α se unen con mayor afinidad a CD47 en un pH ácido (por ejemplo, menos de alrededor de pH 7) y/o bajo condiciones hipóxicas antes que en condiciones fisiológicas. En algunas formas de realización, las variantes de SIRP- α contienen una o más sustituciones de aminoácidos por residuos de histidina o con otros aminoácidos que permitan una unión preferencial de las construcciones de las variantes de la SIRP- α en un sitio de enfermedad. En algunas formas de realización, se impide la unión de las construcciones de las variantes de la SIRP- α con CD47 en un sitio no enfermo mediante un péptido bloqueante. En algunas formas de realización, las construcciones de las variantes de la SIRP- α son dirigidas al sitio de enfermedad (por ejemplo, el tumor) mediante un grupo de direccionamiento (por ejemplo, un anticuerpo dirigido a un antígeno asociado al tumor o un

péptido de unión al anticuerpo). La invención también abarca métodos y composiciones farmacéuticas que contienen construcciones de las variantes de la SIRP- α para tratar diversas enfermedades, como por ejemplo cáncer, preferiblemente un cáncer de tumor sólido y un cáncer hematológico.

En un aspecto, la invención abarca una construcción de una variante de la proteína reguladora de señales α (SIRP- α), en donde dicha construcción de la variante de SIRP- α se une preferencialmente a la CD47 presente sobre células enfermas o en un sitio de enfermedad antes que sobre células no enfermas. En algunas formas de realización, la construcción de la variante de SIRP- α se une a la CD47 presente sobre células enfermas o en un sitio de enfermedad con mayor afinidad de la que se une a CD47 sobre células no enfermas.

En algunas formas de realización, la construcción de la variante de SIRP- α incluye una variante de la SIRP- α unida a un péptido bloqueante. En algunas formas de realización, el péptido bloqueante se une con mayor afinidad a una SIRP- α de tipo salvaje que a la variante de SIRP- α . En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α se une con mayor afinidad a una CD47 de tipo salvaje que al péptido bloqueante.

En algunas formas de realización, el péptido bloqueante es un péptido bloqueante basado en CD47. En algunas formas de realización, el péptido bloqueante basado en CD47 incluye una porción que tiene por lo menos un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia del dominio IgSF de tipo salvaje de CD47 (SEQ ID N°: 35) o un fragmento del mismo. En algunas formas de realización, el péptido bloqueante basado en CD47 tiene la secuencia de la SEQ ID N°: 38 ó 40.

En la presente se proveen construcciones de las variantes de la SIRP- α que comprenden una variante de la SIRP- α descrita en la presente, en donde dicha variante de SIRP- α está unida a un péptido bloqueante descrito en la presente mediante el uso de por lo menos un conector (por ejemplo, un conector clivable). En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α puede comprender el mismo sitio de unión a CD47 que una SIRP- α de tipo salvaje. En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α puede comprender una o más mutaciones o inserciones en comparación con una SIRP- α de tipo salvaje. En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α puede ser una forma truncada de la SIRP- α de tipo salvaje. En algunas formas de realización, el péptido bloqueante puede ser un mimético, una variante o un fragmento de la CD47 según se describe en la presente. En algunas formas de realización, el péptido bloqueante puede presentar una mayor afinidad por una SIRP- α de tipo salvaje, en comparación con la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α . En algunas formas de realización, el péptido bloqueante puede ser un polipéptido de una variante de la CD47 que presenta una menor afinidad por una variante de la SIRP- α en comparación con la CD47 de tipo salvaje. En algunas formas de realización, el conector entre la variante de SIRP- α y el péptido bloqueante puede ser por lo menos un conector que es opcionalmente clivable por una o más proteasas. En algunas formas de realización, el conector también comprende opcionalmente uno o más espaciadores.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α está unida a un péptido bloqueante por medio de un conector clivable y opcionalmente uno o más espaciadores. En algunas formas de realización, el conector clivable se

cliva en un pH ácido y/o una condición hipóxica. En algunas formas de realización, el conector clivable es clivado por una enzima asociada al tumor. En algunas formas de realización, la enzima asociada al tumor es una proteasa. En algunas formas de realización, la proteasa se selecciona del grupo que consiste en matriptasa (MTSP1), activador de plasminógeno tipo urinario (uPA), legumafina, PSA (también denominada KLK3, peptidasa 3 relacionada con calicreína), metaloproteinasa de la matriz-2 (MMP-2), MMP9, elastasa de neutrófilos humanos (HNE) y proteinasa 3 (Pr3). En algunas formas de realización, la proteasa es matriptasa. En algunas formas de realización, el conector clivable tiene la secuencia de LSGRSDNH (SEQ ID N°: 47) o cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 7. En algunas formas de realización, el conector clivable incluye una o una combinación de las siguientes secuencias (véase, por ejemplo, la Tabla 7): PRFKIIGG, PRFRIIGG, SSRHRRALD, RKSSIIIRMRDVVL, SSSFDKGGKYKKGDDA, SSSFDKGGKYKRGDDA, IEGR, IDGR, GGSIDGR, PLGLWA, GPLGIAGI, GPEGLRVG, YGAGLGVV, AGLGVVER, AGLGISST, DVAQFVLT, VAQFVLTE, AQFVLTEG, PVQPIGPQ, L/S/G-/R--/S-/D/N/H, -/s/gs/Rk-/rv/-/-/, SGR-SA, L/S/G-/R--/S-/D/N/H, r/-/-/Rk-/v/-/-/g/-, RQAR-VV, r/-/-/Rk/v/-/-/g, /Kr/RKQ/gAS/RK/A, L/S/G-/R-/S-/D/N/H, -/-/-/N/-/-/-, AAN-L, ATN-L, si/sq/-/yqrs/s/-/-, S/S/K/L/Q, -/p/-/-/li/-/-/-, g/pa/-/gl/-/g/-, G/P/L/G/I/A/G/Q, P/V/G/L/I/G, H/P/V/G/L/L/A/R, -/-/-/viat/-/-/-/ y -/y/y/vta -/-/-/-, donde “-” significa cualquier aminoácido (es decir, cualquier aminoácido natural), la mayúscula indica una preferencia fuerte por dicho aminoácido, la minúscula indica una preferencia menor por dicho aminoácido y “/” separa las posiciones de aminoácidos en los cuales donde es posible más de un aminoácido en una posición adyacente a

“/”.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α está unida a un péptido de unión al anticuerpo. En algunas formas de realización, el péptido de unión al anticuerpo se une a una región constante de un anticuerpo de manera reversible o irreversible. En algunas formas de realización, el péptido de unión al anticuerpo se une al fragmento de la región de unión al antígeno (Fab) de un anticuerpo de manera reversible o irreversible. En algunas formas de realización, el péptido de unión al anticuerpo se une a una región variable de un anticuerpo de manera reversible o irreversible. En algunas formas de realización, el anticuerpo es Cetuximab. En algunas formas de realización, el péptido de unión al anticuerpo tiene por lo menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de un péptido de localización de enfermedad (DLP) (CQFDLSTRRLKC (SEQ ID N°: 64) o CQYNLSSRALKC (SEQ ID N°: 65)) o un fragmento del mismo. En algunas formas de realización, el péptido de unión al anticuerpo tiene la secuencia de la SEQ ID N°: 64.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α está unida a un monómero del dominio Fc. En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α está unida a una albúmina de suero humana (HSA). En algunas formas de realización, la HSA incluye la sustitución de aminoácido C34S y/o K573P, con relación a la SEQ ID N°: 67. En algunas formas de realización, la HSA tiene la siguiente secuencia

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEF
AKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNEC
FLQHKDDNPPLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPEL
LFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFG

ERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRAD
 LAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK
 DVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADP
 HECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVS
 TPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSD
 RVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKK
 QTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVA
 ASQAALGL (SEQ ID N°: 68).

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α está unida a un péptido de unión a albúmina. En algunas formas de realización, el péptido de unión a albúmina tiene la secuencia de la SEQ ID N°: 2. En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α está unida a un polímero, en donde dicho polímero es una cadena de polietilenglicol (PEG) o una cadena de ácido polisiálico.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α está unida a un anticuerpo. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo específico del tumor. En algunas formas de realización, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo específico del tumor) se selecciona del grupo que consiste en cetuximab, pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, MEDI0680, MEDI6469, Ipilimumab, tremelimumab, urelumab, vantictumab, varlilumab, mogamalizumab, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CS1, herceptina, trastuzumab y pertuzumab. En algunas formas de realización, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo específico del tumor) se puede unir a uno o más de los siguientes : 5T4, AGS-16, ALK1, ANG-2, B7-H3, B7-H4, c-fms, c-Met, CA6, CD123, CD19, CD20, CD22, EpCAM, CD30,

CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CD74, CD79b, CD98, CEA, CEACAM5, CLDN18.2, CLDN6, CS1, CXCR4, DLL-4, EGFR, EGP-1, ENPP3, EphA3, ETBR, FGFR2, fibronectina, FR-alfa, GCC, GD2, glipicano-3, GPNMB, HER-2, HER3, HLA-DR, ICAM-1, IGF-1R, IL-3R, LIV-1, mesotelina, MUC16, MUC1, NaPi2b, Nectina-4, Notch 2, Notch 1, PD-L1, PD-L2, PDGFR- α , PS, PSMA, SLTRK6, STEAP1, TEM1, VEGFR, CD25, CD27L, DKK-1 y/o CSF-1R.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad de secuencia con una secuencia de cualquiera de las SEQ ID N°: 3-12 y 24-34.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α tiene la siguiente secuencia

EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPG
RX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYXCX₁₄
KX₁₅RKGSPDDVEX₁₆KSGAGTELSVRKPS (SEQ ID N°: 13), en donde X₁ es
L, I o V; X₂ es V, L o I; X₃ es A o V; X₄ es A, I o L; X₅ es I, T, S o F; X₆ es E, V o
L; X₇ es K o R; X₈ es E o Q; X₉ es H, P o R; X₁₀ es L, T o G; X₁₁ es K o R; X₁₂
es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; X₁₃ es P, A, C, D,
E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y; X₁₄ es V o I; X₁₅ es F, L o V; y X₁₆
es F o V.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α tiene la siguiente secuencia

EEGX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPG
RX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYXCX₁₄

$_4KX_{15}RKGSPDDVEX_{16}KSGAGTELSVRKPS$ (SEQ ID N°: 16), en donde X_1 es L, I o V; X_2 es V, L o I; X_3 es A o V; X_4 es A, I o L; X_5 es I, T, S o F; X_6 es E, V o L; X_7 es K o R; X_8 es E o Q; X_9 es H, P o R; X_{10} es L, T o G; X_{11} es K o R; X_{12} es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; X_{13} es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y; X_{14} es V o I; X_{15} es F, L o V; y X_{16} es F o V.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α tiene la siguiente secuencia

EEEX₁QX₂IQPDKFVLVAAGETX₃TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPG
RX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYXCX₁₄
 $_4KX_{15}RKGSPDDVEX_{16}KSGAGTELSVRKPS$ (SEQ ID N°: 17), en donde X_1 es L, I o V; X_2 es V, L o I; X_3 es A o V; X_4 es A, I o L; X_5 es I, T, S o F; X_6 es E, V o L; X_7 es K o R; X_8 es E o Q; X_9 es H, P o R; X_{10} es L, T o G; X_{11} es K o R; X_{12} es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; X_{13} es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y; X_{14} es V o I; X_{15} es F, L o V; y X_{16} es F o V.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α tiene la siguiente secuencia

EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPG
RX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFPIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYXCX₁₄
 $_4KX_{15}RKGSPDDVEX_{16}KSGAGTELSVRKPS$ (SEQ ID N°: 18), en donde X_1 es L, I o V; X_2 es V, L o I; X_3 es A o V; X_4 es A, I o L; X_5 es I, T, S o F; X_6 es E, V o L; X_7 es K o R; X_8 es E o Q; X_9 es H, P o R; X_{10} es L, T o G; X_{11} es K o R; X_{12} es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; X_{13} es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y; X_{14} es V o I; X_{15} es F, L o V; y X_{16}

es F o V.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α tiene la siguiente secuencia

EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPG
RX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRISX₁₂ITX₁₃ADAGTYXCX₁₄
KX₁₅RKGSPDDVEX₁₆KSGAGTELSVRAPKS (SEQ ID N°: 21), en donde X₁ es
L, I o V; X₂ es V, L o I; X₃ es A o V; X₄ es A, I o L; X₅ es I, T, S o F; X₆ es E, V o
L; X₇ es K o R; X₈ es E o Q; X₉ es H, P o R; X₁₀ es L, T o G; X₁₁ es K o R; X₁₂
es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; X₁₃ es P, A, C, D,
E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y; X₁₄ es V o I; X₁₅ es F, L o V; y X₁₆
es F o V.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α tiene la siguiente secuencia

EEEX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPAR
X₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSEX₁₀TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYXCX₁₄K
X₁₅RKGSPDTEX₁₆KSGAGTELSVRAPKS (SEQ ID N°: 14), en donde X₁ es L, I
o V; X₂ es V, L o I; X₃ es A o V; X₄ es V, I o L; X₅ es I, T, S o F; X₆ es E, V o L;
X₇ es K o R; X₈ es E o Q; X₉ es H, P o R; X₁₀ es S, T o G; X₁₁ es K o R; X₁₂ es
N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; X₁₃ es P, A, C, D, E,
F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y; X₁₄ es V o I; X₁₅ es F, L o V; y X₁₆ es
F o V;.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α tiene la siguiente secuencia

EEEX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILLCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPAR
X₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSEX₁₀TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYXCX₁₄K

X_{15} RKGSPDTEX $_{16}$ KSGAGTELSVRAKPS (SEQ ID N°: 15), en donde X_1 es L, I o V; X_2 es V, L o I; X_3 es A o V; X_4 es V, I o L; X_5 es I, T, S o F; X_6 es E, V o L; X_7 es K o R; X_8 es E o Q; X_9 es H, P o R; X_{10} es S, T o G; X_{11} es K o R; X_{12} es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; X_{13} es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y; X_{14} es V o I; X_{15} es F, L o V; y X_{16} es F o V.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α tiene la siguiente secuencia

EEEX $_1$ QX $_2$ IQPDKSVSVAAGESX $_3$ ILHCTX $_4$ TSLX $_5$ PVGPIQWFRGAGPAR
X $_6$ LIYNQX $_7$ X $_8$ GX $_9$ FPRVTTVSEX $_{10}$ TX $_{11}$ RENMDFSISISX $_{12}$ ITX $_{13}$ ADAGTYCYCX $_{14}$ K
X $_{15}$ RKGSPDTEX $_{16}$ KSGAGTELSVRGKPS (SEQ ID N°: 19), en donde X_1 es L, I o V; X_2 es V, L o I; X_3 es A o V; X_4 es V, I o L; X_5 es I, T, S o F; X_6 es E, V o L; X_7 es K o R; X_8 es E o Q; X_9 es H, P o R; X_{10} es S, T o G; X_{11} es K o R; X_{12} es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; X_{13} es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y; X_{14} es V o I; X_{15} es F, L o V; y X_{16} es F o V.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α tiene la siguiente secuencia

EEEX $_1$ QX $_2$ IQPDKSVSVAAGESX $_3$ ILHCTX $_4$ TSLX $_5$ PVGPIQWFRGAGPAR
X $_6$ LIYNQX $_7$ X $_8$ GX $_9$ FPRVTTVSEX $_{10}$ TX $_{11}$ RENMDFSISISX $_{12}$ ITX $_{13}$ ADAGTYCYCX $_{14}$ K
X $_{15}$ RKGSPDTEX $_{16}$ KSGAGTELSVRAKPS (SEQ ID N°: 22), en donde X_1 es L, I o V; X_2 es V, L o I; X_3 es A o V; X_4 es V, I o L; X_5 es I, T, S o F; X_6 es E, V o L; X_7 es K o R; X_8 es E o Q; X_9 es H, P o R; X_{10} es S, T o G; X_{11} es K o R; X_{12} es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; X_{13} es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y; X_{14} es V o I; X_{15} es F, L o V; y X_{16} es

F o V.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α tiene la siguiente secuencia

EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPA
RX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSEX₁₀TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYCX₁₄
KX₁₅RKGSPDTEX₁₆KSGAGTELSVRKPS (SEQ ID N°: 20), en donde X₁ es L,
I o V; X₂ es V, L o I; X₃ es A o V; X₄ es A, I o L; X₅ es I, T, S o F; X₆ es E, V o L;
X₇ es K o R; X₈ es E o Q; X₉ es H, P o R; X₁₀ es S, T o G; X₁₁ es K o R; X₁₂ es
N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; X₁₃ es P, A, C, D, E,
F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y; X₁₄ es V o I; X₁₅ es F, L o V; y X₁₆ es
F o V.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α tiene la siguiente secuencia

EEX₁X₂QX₃IQPDKX₄VX₅VAAGEX₆X₇X₈LX₉CTX₁₀TSLX₁₁PVGPIQWFRG
AGPX₁₂RX₁₃LIYNQX₁₄X₁₅GX₁₆FPRVTTVSX₁₇X₁₈TX₁₉RX₂₀NMDFX₂₁IX₂₂IX₂₃X₂₄I
TX₂₅ADAGTYCYCX₂₆KX₂₇RKGSPDX₂₈X₂₉EX₃₀KSGAGTELSVRX₃₁KPS (SEQ ID
N°: 23), en donde X₁ es E o G; X₂ es L, I o V; X₃ es V, L o I; X₄ es S o F; X₅ es
L o S; X₆ es S o T; X₇ es A o V; X₈ es I o T; X₉ es H o R; X₁₀ es A, V, I o L; X₁₁
es I, T, S o F; X₁₂ es A o G; X₁₃ es E, V o L; X₁₄ es K o R; X₁₅ es E o Q; X₁₆ es
H, P o R; X₁₇ es D o E; X₁₈ es S, L, T o G; X₁₉ es K o R; X₂₀ es E o N; X₂₁ es S
o P; X₂₂ es S o R; X₂₃ es S o G; X₂₄ es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q,
R, S, T, V, W o Y; X₂₅ es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o
Y; X₂₆ es V o I; X₂₇ es F, L, V; X₂₈ es D o está ausente; X₂₉ es T o V; X₃₀ es F o
V; y X₃₁ es A o G.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α presente en la

construcción de la variante de SIRP- α tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad de secuencia con una secuencia de cualquiera de las SEQ ID N°: 13-23.

En algunas formas de realización, una variante de la SIRP- α en la construcción de la variante de SIRP- α no incluye la secuencia de ninguna de las SEQ ID N°: 3-12 y 24-34.

En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α incluye una o más sustituciones de residuos de aminoácidos por residuos de histidina. En algunas formas de realización, dichas una o más sustituciones de residuos de aminoácidos por residuos de histidina se ubican en una o más de las siguientes posiciones de aminoácido: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 52, 53, 54, 66, 67, 68, 69, 74, 93, 96, 97, 98, 100, 4, 6, 27, 36, 39, 47, 48, 49, 50, 57, 60, 72, 74, 76, 92, 94, 103, con relación a una secuencia de cualquiera de las SEQ ID N°: 3-12.

En algunas formas de realización, la construcción de la variante de SIRP- α se une con por lo menos dos, por lo menos cuatro o por lo menos seis veces más afinidad a la CD47 presente sobre células enfermas o en un sitio de enfermedad que sobre células no enfermas.

En algunas formas de realización, la construcción de la variante de SIRP- α se une con por lo menos dos, por lo menos cuatro o por lo menos seis veces más afinidad a CD47 en un pH ácido que en pH neutro.

En algunas formas de realización, la construcción de la variante de SIRP- α se une con por lo menos dos, por lo menos cuatro o por lo menos seis veces más afinidad a CD47 bajo condiciones hipóxicas que bajo condiciones

fisiológicas.

En algunas formas de realización, la célula enferma es una célula cancerosa de una enfermedad por cáncer.

En algunas formas de realización, el pH ácido es un valor de pH de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 7.

En otro aspecto, la invención abarca una molécula de ácido nucleico que codifica una construcción de la variante de SIRP- α que se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención abarca un vector que incluye la molécula de ácido nucleico que codifica una construcción de la variante de SIRP- α que se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención abarca una célula huésped que expresa una construcción de la variante de SIRP- α que se describe en la presente, en donde dicha célula huésped incluye una molécula de ácido nucleico que codifica una construcción de la variante de SIRP- α descrita en la presente o un vector que incluye la molécula de ácido nucleico, en donde la molécula de ácido nucleico o el vector se expresa en la célula huésped.

En otro aspecto, la invención abarca un método para preparar una construcción de la variante de SIRP- α que se describe en la presente, en donde dicho método incluye: a) proveer una célula huésped que incluya una molécula de ácido nucleico que codifica una construcción de la variante de SIRP- α descrita en la presente o un vector que incluya la molécula de ácido nucleico; b) expresar la molécula de ácido nucleico o el vector en la célula huésped bajo condiciones que permitan la formación de la construcción de la variante de SIRP- α ; y c) recuperar la construcción de la variante de SIRP- α .

En otro aspecto, la invención abarca una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de una construcción de la variante de SIRP- α que se describe en la presente. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica incluye uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención abarca un método para aumentar la fagocitosis de una célula blanco en un sujeto que incluye administrar al sujeto una construcción de la variante de SIRP- α que se describe en la presente o una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de una construcción de la variante de SIRP- α descrita en la presente. En algunas realizaciones, la célula blanco es una célula cancerosa.

En otro aspecto, la invención abarca un método para eliminar las células T reguladoras en un sujeto que incluye administrar al sujeto una construcción de la variante de SIRP- α que se describe en la presente o una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de una construcción de la variante de SIRP- α descrita en la presente.

En otro aspecto, la invención abarca un método para matar una célula cancerosa, donde dicho método incluye poner la célula cancerosa en contacto con una construcción de la variante de SIRP- α que se describe en la presente o con la composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de una construcción de la variante de SIRP- α descrita en la presente.

En otro aspecto, la invención abarca un método para tratar una enfermedad asociada con la actividad de SIRP- α y/o CD47 en un sujeto, donde dicho método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la construcción de la variante de SIRP- α que se describe en la

presente o de la composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de una construcción de la variante de SIRP- α descrita en la presente.

En otro aspecto, la invención abarca un método para tratar una enfermedad asociada con la actividad de SIRP- α y/o CD47 en un sujeto, donde dicho método incluye: (a) determinar las secuencias de aminoácidos de SIRP- α del sujeto; y (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una construcción de la variante de SIRP- α que se describe en la presente; en donde la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α tiene la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de una SIRP- α del sujeto.

En otro aspecto, la invención abarca un método para tratar una enfermedad asociada con la actividad de SIRP- α y/o CD47 en un sujeto, donde dicho método incluye: (a) determinar las secuencias de aminoácidos de SIRP- α del sujeto; y (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una construcción de la variante de SIRP- α que se describe en la presente; en donde la variante de SIRP- α presente en la construcción de la variante de SIRP- α tiene una inmunogenicidad mínima en el sujeto.

En otro aspecto, la invención abarca un método para tratar una enfermedad asociada con la actividad de SIRP- α y/o CD47 en un sujeto, donde dicho método incluye: administrar al sujeto una construcción de la variante de SIRP- α que se describe en la presente, en donde la construcción de la variante de SIRP- α se une preferencialmente a la CD47 presente sobre células enfermas o en un sitio de enfermedad antes que a la CD47 presente sobre células no enfermas.

En algunas formas de realización, la enfermedad es cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer se selecciona entre cáncer de tumor sólido, cáncer hematológico, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de pulmón, cáncer de los bronquios, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y recto, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de vesícula, cáncer con tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuellos, cáncer orofaríngeo, cáncer de esófago, melanoma, cáncer de piel (no melanoma), carcinoma de células de Merkel, cáncer inducido por virus, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de células renales, cáncer de la pelvis renal, leucemia, linfoma, sarcoma, glioma, tumor de cerebro y carcinoma. En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer de tumor sólido. En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer hematológico.

En algunas formas de realización, la enfermedad es una enfermedad autoinmunológica. En algunas formas de realización, la enfermedad inmunológica es una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria. En algunas formas de realización, la enfermedad autoinmune o inflamatoria es esclerosis múltiple, artritis reumatoide, una espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, una enfermedad inflamatoria o autoinmune mediada por anticuerpos, enfermedad de injerto versus huésped, sepsis, diabetes, psoriasis, aterosclerosis, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica progresiva, escleroderma, síndrome coronario agudo, reperusión isquémica, enfermedad

de Crohn, endometriosis, glomerulonefritis, miastenia grave, fibrosis pulmonar idiopática, asma, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), vasculitis o miositis autoinmune inflamatoria.

En otro aspecto, la invención abarca un método para aumentar injerto de células madre hematopoyéticas en un sujeto que incluye modular la interacción entre SIRP- α y CD47 en el sujeto mediante la administración al sujeto de una variante de la SIRP- α que se describe en la presente o una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante de la SIRP- α descrita en la presente.

En otro aspecto, la invención abarca un método para alterar una respuesta inmunológica en un sujeto que incluye administrar al sujeto una construcción de la variante de SIRP- α que se describe en la presente o una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de una construcción de la variante de SIRP- α descrita en la presente, alterando de esa manera la respuesta inmunológica en el sujeto. En algunas formas de realización, la respuesta inmunológica incluye suprimir la respuesta inmunológica.

En algunas formas de realización, el sujeto es un mamífero, preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Definiciones

Según se usa en la presente, el término “células enfermas” y “tejido enfermo” se refieren, por ejemplo, a células y tejidos cancerosos. En particular, el cáncer puede ser un cáncer de tumor sólido o un cáncer hematológico. Por ejemplo, si el cáncer es un cáncer de tumor sólido, las células enfermas son las células del tumor sólido. Las células enfermas a menudo viven bajo las

condiciones características de un sitio de enfermedad, tal como pH ácido e hipoxia. Las “células enfermas” y el “tejido enfermo” también se pueden asociar con otras enfermedades que incluyen, pero en un sentido no taxativo, cáncer. Las “células enfermas” y el “tejido enfermo” también se pueden asociar con una enfermedad o trastorno inmunológico, una enfermedad o un trastorno cardiovascular, una enfermedad o trastorno metabólico o una enfermedad o un trastorno proliferativo. Un trastorno inmunológico incluye una enfermedad o trastorno inflamatorio y una enfermedad o trastorno autoinmune.

Según se usa en la presente, el término “células no enfermas” se refiere a las células normales, sanas, del cuerpo. Las células no enfermas a menudo viven bajo condiciones fisiológicas, tales como pH neutro y una concentración de oxígeno adecuada que conservan un metabolismo y las funciones reguladoras normales de las células.

Según se usa en la presente, el término “sitio de enfermedad” se refiere a la ubicación o área próxima a la ubicación de la enfermedad en el cuerpo. Por ejemplo, si la enfermedad es un cáncer de tumor sólido ubicado en el hígado, entonces el sitio de enfermedad es el sitio del tumor en el hígado y las áreas cercanas al tumor en el hígado. Las células en un sitio de enfermedad pueden incluir células enfermas así como células que soportan la enfermedad en el sitio de enfermedad. Por ejemplo, si el sitio de enfermedad es el sitio de un tumor, las células en el sitio del tumor incluyen tanto células enfermas (por ejemplo, células tumorales) como las células que soportan el crecimiento del tumor en el sitio del tumor. De manera similar, el término “sitio del cáncer” se refiere a la ubicación del cáncer en el cuerpo.

Según se usa en la presente, el término “dominio D1 de SIRP- α ” o

“dominio D1” se refiere al dominio de la membrana distal, extracelular, de SIRP- α . El dominio D1 de SIRP- α está ubicado por el extremo N-terminal de una SIRP- α de tipo salvaje de longitud completa y media la unión a CD47. Las secuencias de aminoácidos de los dominios D1 se muestran en la Tabla 1.

Según se usa en la presente, el término “dominio D2 de SIRP- α ” o “dominio D2” se refiere al segundo dominio extracelular de SIRP- α . El dominio D2 de la SIRP- α incluye aproximadamente los aminoácidos 119 a 220 de una SIRP- α de tipo salvaje de longitud completa.

Según se usa en la presente, el término “dominio D3 de SIRP- α ” o “dominio D3” se refiere al tercer dominio extracelular de SIRP- α . El dominio D3 de la SIRP- α incluye aproximadamente los aminoácidos 221 a 320 de una SIRP- α de tipo salvaje de longitud completa.

Según se usa en la presente, el término “polipéptido de SIRP- α ” se refiere a una SIRP- α de tipo salvaje así como a una variante de la SIRP- α , según se define y describe cada término en la presente.

Según se usa en la presente, el término “variante de SIRP- α ” se refiere a un polipéptido que contiene un dominio D1 de SIRP- α o una porción de unión a CD47 de una SIRP- α de longitud completa. En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad de secuencia con una secuencia de cualquiera de las SEQ ID N°: 3-12 y 24-34. En algunas formas de realización, una variante de la SIRP- α tiene una mayor afinidad por una CD47 que una SIRP- α de tipo salvaje. En algunas formas de realización, una variante de la SIRP- α contiene una porción de la SIRP- α de tipo salvaje humana (preferiblemente una porción de unión a CD47

de la SIRP- α de tipo salvaje) y/o comprende una o más sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, una variante de la SIRP- α puede contener sustituciones de uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc, con un máximo de 20) residuos de aminoácidos con relación a una SIRP- α de tipo salvaje. Por ejemplo, una variante de la SIRP- α puede contener sustituciones de uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc, con un máximo de 20) residuos de histidina. En algunas formas de realización, las variantes de SIRP- α tienen una porción que tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de SIRP- α de tipo salvaje humana o con cualquiera de las variantes de SIRP- α que se describen en la presente (por ejemplo, con una secuencia de una porción de unión a CD47 de una SIRP- α de tipo salvaje humana). Una porción de unión a CD47 de la SIRP- α de tipo salvaje incluye el dominio D1 de la SIRP- α de tipo salvaje (una secuencia de cualquiera de las SEQ ID N°: 3-12).

Según se usa en la presente, el término “construcción de la variante de SIRP- α ” se refiere a un polipéptido que contiene una variante de la SIRP- α unida, por ejemplo, a un péptido bloqueante, un monómero del dominio Fc, una HSA, un péptido de unión a albúmina, un polímero, un péptido de unión al anticuerpo, un anticuerpo. En algunas formas de realización, una construcción de la variante de SIRP- α tiene una actividad preferencial en un sitio de enfermedad. En algunas formas de realización, las construcciones de las variantes de la SIRP- α tienen una actividad preferencial en un sitio de enfermedad e incluyen una variante de la SIRP- α que contiene una porción que

tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de SIRP- α de tipo salvaje humana o con cualquiera de las variantes de SIRP- α que se describen en la presente (por ejemplo, con una secuencia de una porción de unión a CD47 de SIRP- α de tipo salvaje humana).

Según se usa en la presente, el término “porcentaje (%) de identidad” se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos (o de ácidos nucleicos) de una secuencia candidato, por ejemplo, una variante de la SIRP- α , que son idénticos a los residuos de aminoácidos (o ácidos nucleicos) de una secuencia de referencia, por ejemplo, una SIRP- α de tipo salvaje humana o una porción de unión a CD47 de la misma, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad (es decir, se pueden introducir huecos en una o ambas secuencias candidato y de referencia para un alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas se pueden descartar a efectos comparativos). El alineamiento para determinar el porcentaje de identidad se puede efectuar de varias maneras que son propias del conocimiento en el arte, por ejemplo, usando un software para computadora disponible al público, tal como el software BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los especialistas en el arte pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, que incluyan cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo sobre la longitud completa de las secuencias que están siendo comparadas. En algunas formas de realización, el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos (o de ácidos nucleicos) de una secuencia candidato dada por, con o contra una

secuencia de referencia dada (que, como alternativa, se podría formular como una secuencia candidato dada que tiene o incluye un porcentaje determinado de identidad de secuencia de aminoácidos (o de ácidos nucleicos) por, con o contra una secuencia de referencia dada) se calcula de la siguiente manera:

$$100 \times (\text{fracción de } A/B)$$

donde A es el número de residuos de aminoácidos (o de ácidos nucleicos) calificados como idénticos en el alineamiento de la secuencia candidato y la secuencia de referencia, y donde B es el número total de residuos de aminoácidos (o de ácidos nucleicos) en la secuencia de referencia. En algunas formas de realización, en las cuales la longitud de la secuencia candidato no es igual a la longitud de la secuencia de referencia, el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos (o de ácidos nucleicos) de la secuencia candidato con la secuencia de referencia no sería igual al porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos (o de ácidos nucleicos) de la secuencia de referencia con la secuencia candidato.

En formas de realización particulares, una secuencia de referencia alineada para su comparación con una secuencia candidato puede mostrar que la secuencia candidato presenta entre un 50% y un 100% de identidad por toda la longitud completa de la secuencia candidato o una porción seleccionada de residuos de aminoácidos (o ácidos nucleicos) contiguos de la secuencia candidato. La longitud de la secuencia candidato alineada con fines comparativos es de por lo menos un 30%, por ejemplo, por lo menos un 40%, por ejemplo, por lo menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Cuando una posición en la secuencia candidato está ocupada por el mismo residuo de aminoácido (o de ácido nucleico) que en

la posición correspondiente en la secuencia de referencia, entonces las moléculas son idénticas en dicha posición.

Según se usa en la presente, el término “proteasa asociada al tumor” o “enzima tumoral” se refiere a una enzima, por ejemplo, una proteasa, que está presente a un mayor nivel en un cáncer, por ejemplo, un cáncer de tumor sólido. En algunas formas de realización, la proteasa asociada al tumor puede clivar un conector clivable.

Según se usa en la presente, el término “péptido bloqueante” se refiere a un péptido que se puede unir a una variante de la SIRP- α y bloquear o “enmascarar” la porción de unión a CD47 de la variante de SIRP- α . En una construcción de la variante de SIRP- α , el péptido bloqueante se puede unir a una variante de la SIRP- α por medio de un conector que es opcionalmente clivable, y opcionalmente uno o más espaciadores. El péptido bloqueante se puede acoplar por medio de enlaces no covalentes a la variante de SIRP- α y clivar en un sitio de enfermedad o en una célula enferma. En algunas formas de realización, el péptido bloqueante se puede unir a una SIRP- α de tipo salvaje en el sitio de enfermedad o en la célula enferma. Se puede usar un péptido bloqueante para reducir o minimizar la unión de la variante de SIRP- α con la CD47 de tipo salvaje bajo condiciones fisiológicas normales o en un sitio no enfermo. En algunas formas de realización, el péptido bloqueante tiene una mayor afinidad de unión por una SIRP- α de tipo salvaje que por una variante de la SIRP- α . El péptido bloqueante se puede disociar de la variante de SIRP- α para unirse a una SIRP- α de tipo salvaje, por ejemplo, en un sitio de enfermedad o bajo condiciones no fisiológicas. Un ejemplo de un péptido bloqueante es un péptido bloqueante basado en CD47, que es un péptido

derivado de CD47 o un fragmento del mismo. En algunas formas de realización, un péptido bloqueante basado en CD47 es la porción de unión a SIRP- α extracelular de la CD47 (es decir, el dominio IgSF de CD47). En algunas formas de realización, un péptido bloqueante basado en CD47 incluye una o más sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácidos con relación a la CD47 de tipo salvaje.

Según se usa en la presente, el término “conector clivable” se refiere a un conector entre dos porciones de una construcción de la variante de SIRP- α . En algunas formas de realización, un conector clivable puede unir de manera covalente un péptido bloqueante a una variante de la SIRP- α a fin de bloquear la unión de la variante de SIRP- α a la CD47 bajo condiciones fisiológicas. En algunas formas de realización, se puede incluir un conector clivable en un péptido bloqueante, que se podría asociar de manera no covalente con la variante de SIRP- α a fin de bloquear la unión de la variante de SIRP- α a la CD47 bajo condiciones fisiológicas. El conector clivable se puede clivar bajo determinadas condiciones. Si el conector clivable está dentro de un péptido bloqueante, el clivaje del conector inactivaría al péptido bloqueante. El conector clivable contiene un grupo cuya acción cliva o induce el clivaje del conector bajo las condiciones características de un sitio de enfermedad, tal como un sitio de cáncer, por ejemplo, dentro de un tumor sólido. El conector clivable es estable bajo condiciones fisiológicas sanas (por ejemplo, un pH neutro y una concentración de oxígeno adecuada). Dicho grupo puede ser un grupo químico funcional sensible al pH (por ejemplo, acetales, cetales, tiomaleamatos, hidrazonas, enlaces disulfuro) que se puede hidrolizar en un pH ácido. Dicho grupo también puede ser un grupo químico funcional sensible a hipoxia (por

ejemplo, quinonas, N-óxidos y grupos nitro heteroaromáticos) o aminoácidos que se puedan reducir bajo condiciones hipóxicas. El grupo presente en el conector clivable también puede ser un sustrato proteico que puede ser reconocido y clivado por una proteasa asociada al tumor, enzima o peptidasa.

Según se usa en la presente, el término “espaciador” se refiere a un enlace covalente o no covalente entre dos porciones de una construcción de la variante de SIRP- α , tal como el conector (por ejemplo, un conector clivable) y la variante de SIRP- α , o entre el péptido de unión al anticuerpo y la variante de SIRP- α . Preferiblemente, el espaciador es un enlace covalente. Un espaciador puede ser un simple enlace químico, por ejemplo, un enlace amida, o una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una secuencia de 3-200 aminoácidos). Un espaciador de aminoácidos forma parte de la secuencia primaria de un polipéptido (por ejemplo, unido a los polipéptidos del espacio o dominios de polipéptido por medio del esqueleto de polipéptidos). El espaciador provee espacio y/o flexibilidad entre las dos porciones. El espaciador es estable bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo, a pH neutro y a una concentración de oxígeno adecuada) así como bajo condiciones características de un sitio de enfermedad, por ejemplo, pH ácido e hipoxia. El espaciador es estable en un sitio de enfermedad, tal como un sitio de cáncer, por ejemplo, dentro de un tumor. Las descripciones de los espaciadores se proveen con detalle más adelante en la presente.

Según se usa en la presente, el término “anticuerpo” se refiere a anticuerpos intactos, fragmentos de anticuerpos, siempre que tengan la actividad biológica deseada, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos y anticuerpos multiespecíficos (por

ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos. Preferiblemente, el anticuerpo es específico de una célula enferma, por ejemplo, una célula tumoral. Por ejemplo, el anticuerpo se puede unir específicamente a una proteína de la superficie celular sobre una célula enferma, por ejemplo, una célula tumoral.

Según se usa en la presente, el término “péptido de unión a albúmina” se refiere a una secuencia de aminoácidos de entre 12 y 16 aminoácidos que tiene afinidad por la albúmina de suero y su función es la de unirse a la misma. Un péptido de unión a albúmina puede ser de diferentes orígenes, por ejemplo, de humanos, de ratón o de rata. En algunas formas de realización de la presente invención, una construcción de la variante de SIRP- α puede incluir un péptido de unión a albúmina que se fusiona al extremo C-terminal de la variante de SIRP- α para aumentar la vida media en suero de la variante de SIRP- α . El péptido de unión a albúmina se puede fusionar, ya sea directamente o a través de un espaciador, a la variante de SIRP- α .

Según se usa en la presente, el término “albúmina de suero humana (HSA)” se refiere a la proteína albúmina presente en el plasma sanguíneo humano. La albúmina de suero humana es la proteína más abundante en la sangre. Constituye aproximadamente la mitad de las proteínas en suero sanguíneo. En algunas formas de realización, la albúmina de suero humana tiene la secuencia de los aminoácidos 25-609 (SEQ ID N°: 67) de UniProt, ID N°: P02768. En algunas formas de realización, la albúmina de suero humana contiene además C34S con relación a la secuencia de la SEQ ID N°: 67.

Según se usa en la presente, el término “monómero del dominio Fc” se refiere a una cadena de polipéptidos que incluye el segundo y tercer dominios

constantes del anticuerpo (C_{H2} y C_{H3}). En algunas formas de realización, el monómero del dominio Fc también incluye un dominio bisagra. El monómero del dominio Fc puede ser cualquier isotipo de anticuerpo inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgE, IgM, IgA o IgD. Adicionalmente, el monómero del dominio Fc puede ser un subtipo de la IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgG4). Un monómero del dominio Fc no incluye ninguna porción de una inmunoglobulina que pueda actuar como una región de reconocimiento del antígeno, por ejemplo, un dominio variable o una región determinante de complementariedad (CDR). Los monómeros del dominio Fc pueden incluir tanto como diez cambios con respecto a una secuencia del monómero del dominio Fc de tipo salvaje (por ejemplo, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4 sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos) que alteran la interacción entre un dominio Fc y un receptor Fc. Los ejemplos de cambios adecuados son conocidos en el arte.

Según se usa en la presente, el término “dominio Fc” se refiere a un dímero de dos monómeros del dominio Fc. En el dominio Fc de tipo salvaje, los dos monómeros del dominio Fc se dimerizan por la interacción entre los dos dominios constantes C_{H3} del anticuerpo, así como uno o más enlaces disulfuro que se forman entre los dominios bisagra de los dos monómeros del dominio Fc que se dimerizan. En algunas formas de realización, el dominio Fc se puede mutar para que le falten las funciones efectoras, lo cual es típico de un “dominio Fc muerto”. En determinadas formas de realización, cada uno de los monómeros del dominio Fc en un dominio Fc incluye las sustituciones de aminoácidos en el dominio constante C_{H2} del anticuerpo para reducir la interacción o unión entre el dominio Fc y un receptor Fcγ.

Según se usa en la presente, el término “afinidad” o “afinidad de unión”

se refiere a la fuerza de la interacción de unión entre dos moléculas. En general, la afinidad de unión se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre una molécula y su miembro de unión, tal como una variante de la SIRP- α y CD47. A menos que se indique de otra manera, la afinidad de unión se refiere a la afinidad de unión intrínseca, que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión. La afinidad de unión entre dos moléculas habitualmente se describe por la constante de disociación (K_D) o la constante de afinidad (K_A). Dos moléculas que tienen una baja afinidad de unión entre sí generalmente se unen lentamente, tienden a disociarse fácilmente y presentan un valor de K_D grande. Dos moléculas que tienen una gran afinidad entre sí en general se unen fácilmente, tienden a permanecer unidas por más tiempo y presentan un valor de K_D pequeño. La K_D de dos moléculas que interactúan se puede determinar usando métodos y técnicas bien conocidas en el arte, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial. La K_D se calcula como la relación de k_{off}/k_{on} .

Según se usa en la presente, el término “célula huésped” se refiere a un vehículo que incluye los componentes celulares necesarios, por ejemplo, organelas, que se precisan para expresar proteínas a partir de sus ácidos nucleicos correspondientes. Los ácidos nucleicos se incluyen típicamente en vectores de ácidos nucleicos que se pueden introducir en la célula huésped mediante técnicas convencionales conocidas en el arte (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa, etc.). Una célula huésped puede ser una célula procariota, por ejemplo, una célula bacteriana, o una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero (por ejemplo, una célula CHO). Según se

describe en la presente, se emplea una célula huésped para expresar una o más construcciones de las variantes de la SIRP- α .

Según se usa en la presente, el término “composición farmacéutica” se refiere a una formulación medicinal o farmacéutica que contiene un ingrediente activo, así como excipientes y diluyentes para facilitar al ingrediente activo adecuado para el método de administración. La composición farmacéutica de la presente invención incluye componentes farmacéuticamente aceptables que son compatibles con la construcción de la variante de SIRP- α . La composición farmacéutica se puede encontrar en la forma de un comprimido o una cápsula para una administración por vía oral o en una forma acuosa para una administración intravenosa o subcutánea.

Según se usa en la presente, el término “enfermedad asociada con la actividad de SIRP- α y/o CD47” se refiere a cualquier enfermedad o trastorno causado y/o relacionado con la actividad de SIRP- α y/o CD47. Por ejemplo, cualquier enfermedad o trastorno causado y/o relacionado con el aumento y/o la disminución de la actividad de SIRP- α y/o CD47. Los ejemplos de enfermedades asociadas con la actividad de SIRP- α y/o de CD47 incluyen, pero en un sentido no taxativo, cánceres y enfermedades inmunológicas (por ejemplo, enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias).

Según se usa en la presente, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de una construcción de la variante de SIRP- α de la invención o una composición farmacéutica que contiene una construcción de la variante de SIRP- α de la invención que sea eficaz para lograr el efecto terapéutico deseado en el tratamiento de un paciente que sufre de una enfermedad, tal como el cáncer, por ejemplo, un cáncer de tumor sólido o un

cáncer hematológico. En particular, la cantidad terapéutica eficaz de la construcción de la variante de SIRP- α evita los efectos secundarios adversos.

Según se usa en la presente, el término “afinidad optimizada” o “afinidad de unión optimizada” se refiere a una fuerza optimizada de la interacción de unión entre una variante de la SIRP- α y la CD47. En algunas formas de realización, la construcción de la variante de SIRP- α se une primariamente, o con mayor afinidad, a una CD47 presente sobre las células en un sitio de enfermedad (es decir, células cancerosas) y no se une sustancialmente o se une con menor afinidad a la CD47 sobre las células en un sitio no enfermo (es decir, células no cancerosas). La afinidad de unión entre la variante de SIRP- α y CD47 está optimizada de manera tal que la interacción no causa una toxicidad clínicamente relevante. En algunas formas de realización, a fin de lograr una afinidad de unión optimizada entre la variante de SIRP- α y la CD47, se puede desarrollar una variante de SIRP- α que tenga una menor afinidad de unión a CD47 que la máxima afinidad que se puede lograr.

Según se usa en la presente, el término “inmunogenicidad” se refiere a la propiedad de una proteína (por ejemplo, una proteína terapéutica) que causa una respuesta inmunológica en el huésped como si fuera un antígeno extraño. La inmunogenicidad de una proteína puede evaluarse *in vitro* de muchas maneras diferentes, en particular mediante ensayos de proliferación de células T *in vitro* (véase, por ejemplo, Jawa y col., *Clinical Immunology* 149: 534-555, 2013), algunas de las cuales se encuentran disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, los servicios de ensayos de inmunogenicidad ofrecidos por Proimmune).

Según se usa en la presente, el término “inmunogenicidad mínima” se

refiere a la inmunogenicidad de una proteína (por ejemplo, una proteína terapéutica) que fue modificada, es decir, mediante sustituciones de aminoácidos, para que sea menor (por ejemplo, por lo menos un 10%, 25%, 50% o 100% menos) de lo que hubiera sido antes de introducir las sustituciones de aminoácidos. Cuando se modifica una proteína (por ejemplo, una proteína terapéutica) para que tenga una inmunogenicidad mínima significa que no genera o genera muy poca respuesta inmunológica en el huésped aún cuando se trata de un antígeno extraño.

Según se usa en la presente, el término “farmacocinética optimizada” se refiere a que los parámetros asociados en general con la farmacocinética de una proteína se mejoran y modifican para producir una proteína optimizada para su uso *in vitro* y/o *in vivo*. Los parámetros que están asociados con la farmacocinética de una proteína son bien conocidos por un especialista, incluyendo, por ejemplo, la K_D , la valencia y la vida media. En la presente invención, la farmacocinética de una construcción de la variante de SIRP- α de la invención se optimiza para su interacción con la CD47 para su uso en un contexto terapéutico

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

En la Figura 1 se muestra una porción de la estructura cocrystalizada de CD47:SIRP- α (PDB: 4KJY, 4CMM), el extremo N terminal de CD47 existe como un piro-glutamato y forma interacciones de enlace de hidrógeno con la Thr66 de una variante SIRP- α o la Leu66 de una SIRP- α de tipo salvaje.

En la Figura 2 se muestran modelos computacionales del sitio de interacción entre CD47 que tiene SIRP- α T102Q y de tipo salvaje que tiene A27

(izquierda) y el sitio de interacción entre CD47 que tiene T102Q y una variante de SIRP- α que tiene I27.

En la Figura 3 se muestra una SDS-PAGE de construcciones de variantes de SIRP- α (SEQ ID NOs: 48-56).

En la Figura 4A se muestra una SDS-PAGE de construcciones de variantes de SIRP- α (SEQ ID NO: 54) después del clivaje *in vitro* con uPA y matriptasa.

En la Figura 4B se muestra una SDS-PAGE de construcciones de variantes de SIRP- α (SEQ ID NO: 54) después del clivaje *in vitro* con cantidades diferentes de matriptasa.

En la Figura 4C se muestra una SDS-PAGE de diferentes construcciones de variantes de SIRP- α (SEQ ID NOs: 57-63) después del clivaje *in vitro* con matriptasa.

En la Figura 5A se muestra un gráfico de barras que ilustra las diferentes afinidades de unión de diferentes construcciones de variantes de SIRP- α (SEQ ID NOs: 48-55) contra CD47 antes y después del clivaje *in vitro* con matriptasa.

En la Figura 5B se muestra un gráfico de barras que ilustra diferentes afinidades de unión de diferentes construcciones de variantes de SIRP- α (SEQ ID NOs: 52-63) y la variante SIRP- α (SEQ ID NO: 31) contra CD47 antes y después del clivaje *in vitro* con matriptasa.

En la Figura 6 se muestra un sensograma que demuestra que una construcción variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 66) puede unirse a Cetuximab y CD47 simultáneamente.

En la Figura 7A se muestra un esquema del complejo cuaternario que contiene EGFR, Cetuximab, una construcción variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 66), y CD47.

En la Figura 7B se muestra un sensograma que demuestra la formación del complejo cuaternario mostrado en la Figura 7A.

La Figura 7C es una imagen del sensograma mostrado en la Figura 7B.

La Figura 8 es un gráfico de dispersión que muestra la fagocitosis inducida por la construcción variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 66) y la variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 31).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La invención abarca construcciones de variantes de la proteína reguladora de señales α (SIRP- α) que tienen una actividad preferencial en un sitio de enfermedad (por ejemplo, en el sitio de un tumor antes que en un sitio no enfermo). En determinadas formas de realización, las construcciones de las variantes de la SIRP- α tienen una mayor afinidad de unión por una CD47 presente sobre células enfermas (por ejemplo, células tumorales). En algunas formas de realización, las variantes de SIRP- α pueden contener una o más sustituciones de aminoácidos. En algunas formas de realización, los aminoácidos se pueden sustituir por residuos de histidina. En algunas formas de realización, los aminoácidos se pueden sustituir por otros residuos de aminoácidos que no son histidina. En algunas formas de realización, las construcciones de las variantes de la SIRP- α se unen con mayor afinidad a la CD47 presente sobre células enfermas o en un sitio de enfermedad que sobre células no enfermas y bajo condiciones característica de un sitio de enfermedad, tal como un sitio de cáncer, por ejemplo, en el sitio del tumor o en

el interior del mismo. En algunas formas de realización, las construcciones de las variantes de SIRP- α se unen con mayor afinidad a CD47 en un pH ácido (por ejemplo, menos de alrededor de pH 7) y/o bajo condiciones hipóxicas antes que en condiciones fisiológicas. En algunas formas de realización, las construcciones de las variantes de la SIRP- α incluyen una variante de la SIRP- α y un péptido bloqueante; el péptido bloqueante impide la unión de la variante de SIRP- α a CD47 salvo bajo las condiciones características de un sitio de enfermedad. En algunas formas de realización, las variantes de SIRP- α se fusionan a un monómero del dominio Fc, una albúmina de suero humana (HSA), un péptido de unión a albúmina o un polímero (por ejemplo, un polímero de polietilenglicol (PEG)). En algunas formas de realización, las construcciones de las variantes de la SIRP- α presentan una inmunogenicidad, afinidad y/o farmacocinética optimizada para su uso en un contexto terapéutico. En algunas formas de realización, las construcciones de las variantes de la SIRP- α son dirigidas preferencialmente hacia los sitios de enfermedad, por ejemplo, un tumor, por medio de un grupo de direccionamiento, por ejemplo, un anticuerpo específico del blanco. La invención abarca métodos y composiciones farmacéuticas que contienen construcciones de las variantes de la SIRP- α para tratar varias enfermedades, como por ejemplo cáncer, preferiblemente un cáncer de tumor sólido o hematológico, así como métodos para matar las células cancerosas y métodos para elaborar las construcciones de las variantes de la SIRP- α y composiciones farmacéuticas que contienen dichas construcciones de las variantes de la SIRP- α .

En algunas formas de realización, la construcción de la variante de SIRP- α incluye una variante de la SIRP- α unida a un péptido bloqueante. En

algunas formas de realización, la unión preferencial de la variante de SIRP- α en la construcción de la variante de SIRP- α a la CD47 presente sobre células enfermas o sitios de enfermedad se puede lograr mediante la unión del péptido bloqueante a la variante de SIRP- α mediante el uso de un conector clivable, que es clivado en las células enfermas o en los sitios de enfermedad. En algunas formas de realización, la unión preferencial de la variante de SIRP- α en la construcción de la variante de SIRP- α a la CD47 presente sobre células enfermas o en sitios de enfermedad se puede lograr mediante la unión del péptido de bloqueo a la variante de SIRP- α , en donde el péptido bloqueante se puede desprender o simplemente disociar de la variante de SIRP- α en las células enfermas o en los sitios de enfermedad.

I. Variantes de SIRP- α

Existen por lo menos diez variantes naturales de la SIRP- α de tipo salvaje humana. Las secuencias de aminoácidos de los dominios D1 de las diez variantes de la SIRP- α de tipo salvaje humana se muestran en las SEQ ID N°: 3-12 (véase la Tabla 1). En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad de secuencia con una secuencia de cualquiera de las SEQ ID N°: 3-12. En la Tabla 2 se enumeran las posibles sustituciones de aminoácidos en cada variante del dominio D1 (SEQ ID N°: 13-23). En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α se une con una afinidad de unión optimizada a la CD47. En algunas formas de realización, la construcción de la variante de SIRP- α que incluye una variante de la SIRP- α se une primariamente o con mayor afinidad a la CD47 presente sobre células cancerosas y no se une sustancialmente o se

une con menor afinidad a la CD47 presente sobre células no cancerosas. En algunas formas de realización, la afinidad de unión entre la construcción de la variante de SIRP- α y CD47 está optimizada de manera tal que la interacción no causa una toxicidad clínicamente relevante. En algunas formas de realización, la construcción de la variante de SIRP- α tiene una inmunogenicidad mínima. En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α comprende los mismos aminoácidos que los aminoácidos del polipéptido de SIRP- α en una muestra biológica del sujeto, excepto por los cambios de aminoácidos introducidos para aumentar la afinidad de la variante de SIRP- α . Las técnicas y los métodos para generar las variantes de SIRP- α y determinar sus afinidades de unión a la CD47 se describen con más detalle en la presente.

En la Tabla 2 se enumeran las sustituciones de aminoácidos específicas en una variante de la SIRP- α , con relación a cada secuencia de variantes del dominio D1. Una variante de la SIRP- α puede incluir una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez) de las sustituciones enumeradas en la Tabla 2. En algunas formas de realización, una variante de la SIRP- α incluye como máximo diez sustituciones de aminoácidos con relación a un dominio D1 de tipo salvaje. En algunas formas de realización, una variante de la SIRP- α incluye como máximo siete sustituciones de aminoácidos con relación a un dominio D1 de tipo salvaje.

En algunas formas de realización, una variante de la SIRP- α es una variante quimérica de una SIRP- α que incluye una porción de dos o más variantes del dominio D1 de tipo salvaje (por ejemplo, una porción de una variante del dominio D1 de tipo salvaje y una porción de otra variante del dominio D1 de tipo salvaje). En algunas formas de realización, una variante

quimérica de SIRP- α incluye por lo menos dos porciones (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, etc.) de las variantes del dominio D1 de tipo salvaje, en donde cada una de las porciones es de una variante diferente del dominio D1 de tipo salvaje. En algunas formas de realización, una variante quimérica de SIRP- α también incluye una o más de las sustituciones de aminoácidos enumeradas en la Tabla 2. En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad de secuencia con una secuencia de cualquiera de las SEQ ID N°: 24 34 en la Tabla 3.

Tabla 1. Secuencias de los dominios D1 de la SIRP- α de tipo salvaje

Variante 1 del dominio D1 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 3)	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGR ELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTY YCV KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVR AKPS
Variante 2 del dominio D1 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 4)	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPAR ELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTY YCV KFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR AKPS
Variante 3 del dominio D1 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 5)	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILLCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPAR ELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTY YCV KFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR AKPS
Variante 4 del dominio D1 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 6)	EEGLQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGR ELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTY YCV KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVR AKPS
Variante 5 del dominio D1 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 7)	EEELQVIQPDKFVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGR ELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTY YCV KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVR AKPS
Variante 6 del dominio D1 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 8)	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGR ELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFPIRIGNITPADAGTY YCV KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVR AKPS

Variante 7 del dominio D1 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 9)	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPAR ELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYTCV KFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRGKPS
Variante 8 del dominio D1 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 10)	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPAR ELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYTCV KFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
Variante 9 del dominio D1 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 11)	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGR ELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTNRNNMDFSIRISNITPADAGTYTCV KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
Variante 10 del dominio D1 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 12)	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPAR ELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYTCV KFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS

Tabla 2. Sustituciones de aminoácidos en una variante de la SIRP- α , con relación a cada variante del dominio D1

v1 del dominio D1 (SEQ ID N°: 13)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVLVAAGETX ₃ TLRCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRG AGPGRX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSDX ₁₀ TX ₁₁ RNNMDFSIRIGX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYTCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDDVEX ₁₆ KSGAGTELSVRAKPS
Sustituciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID N°: 13	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =A, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =L, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v2 del dominio D1 (SEQ ID N°: 14)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVSVAAGESX ₃ ILHCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGA GPARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYTCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDTEX ₁₆ KSGAGTELSVRAKPS
Sustituciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID N°: 14	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =V, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =S, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V

v3 del dominio D1 (SEQ ID N°: 15)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVSVAAGESX ₃ ILLCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGA GPARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDTEX ₁₆ KSGAGTELSVRKPS
Sustituciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID N°: 15	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =V, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =S, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v4 del dominio D1 (SEQ ID N°: 16)	EEGX ₁ QX ₂ IQPDKSVSVAAGESX ₃ ILHCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRG AGPGRX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSDX ₁₀ TX ₁₁ RNNMDFSIRIGX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDDVEX ₁₆ KSGAGTELSVRKPS
Sustituciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID N°: 16	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =A, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =L, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v5 del dominio D1 (SEQ ID N°: 17)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKFVLVAAGETX ₃ TLRCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRG AGPGRX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSDX ₁₀ TX ₁₁ RNNMDFSIRIGX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDDVEX ₁₆ KSGAGTELSVRKPS
Sustituciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID N°: 17	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =A, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =L, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v6 del dominio D1 (SEQ ID N°: 18)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVLVAAGETX ₃ TLRCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRG AGPGRX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSDX ₁₀ TX ₁₁ RNNMDFPIRIGX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDDVEX ₁₆ KSGAGTELSVRKPS
Sustituciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID N°: 18	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =A, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =L, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v7 del dominio D1 (SEQ ID N°: 19)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVSVAAGESX ₃ ILHCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGA GPARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDTEX ₁₆ KSGAGTELSVRGKPS

Sustituciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID N°: 19	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =V, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =S, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v8 del dominio D1 (SEQ ID N°: 20)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVLVAAGETX ₃ TLRCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRG AGPARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYXCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDTEX ₁₆ KSGAGTELSVRAKPS
Sustituciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID N°: 20	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =A, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =S, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v9 del dominio D1 (SEQ ID N°: 21)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVLVAAGETX ₃ TLRCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRG AGPGRX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSDX ₁₀ TX ₁₁ RNNMDFSIRISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYXCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDDVEX ₁₆ KSGAGTELSVRAKPS
Sustituciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID N°: 21	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =A, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =L, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
v10 del dominio D1 (SEQ ID N°: 22)	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVSVAAGESX ₃ ILHCTX ₄ TSLX ₅ PVGPIQWFRGA GPARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYXCX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPDTEX ₁₆ KSGAGTELSVRAKPS
Sustituciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID N°: 22	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =V, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =S, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
Pan dominio D1 (SEQ ID N°: 23)	EEX ₁ X ₂ QX ₃ IQPDKX ₄ VX ₅ VAAGEX ₆ X ₇ X ₈ LX ₉ CTX ₁₀ TSLX ₁₁ PVGPIQWFRGAGPX ₁₂ RX ₁₃ LIYNQX ₁₄ X ₁₅ GX ₁₆ FPRVTTVVSX ₁₇ X ₁₈ TX ₁₉ RX ₂₀ NMDFX ₂₁ IX ₂₂ IX ₂₃ X ₂₄ ITX ₂₅ ADAGTYXCX ₂₆ KX ₂₇ RKGSPDX ₂₈ X ₂₉ EX ₃₀ KSGAGTELSVRX ₃₁ KPS

Sustituciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID N°: 23	X ₁ =E, G; X ₂ =L, I, V; X ₃ =V, L, I; X ₄ =S, F; X ₅ =L, S; X ₆ =S, T; X ₇ =A, V; X ₈ =I, T; X ₉ =H, R; X ₁₀ =A, V, I, L; X ₁₁ =I, T, S, F; X ₁₂ =A, G; X ₁₃ =E, V, L; X ₁₄ =K, R; X ₁₅ =E, Q; X ₁₆ =H, P, R; X ₁₇ =D, E; X ₁₈ =S, L, T, G; X ₁₉ =K, R; X ₂₀ =E, N; X ₂₁ =S, P; X ₂₂ =S, R; X ₂₃ =S, G; X ₂₄ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₂₅ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₂₆ =V, I; X ₂₇ =F, L, V; X ₂₈ =D o está ausente; X ₂₉ =T, V; X ₃₀ =F, V; y X ₃₁ =A, G
--	---

Tabla 3. SEQ ID N°: 24-34

SEQ N°	ID	Secuencia
24		EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQ REGHFPRVTTVSETTRRENMDFSISISNITPADAGTYCYCVKFRKGSPDTE VKSGAGTELSVRAKPS
25		EEEVQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTLTSLIPVGPIQWFRGAGPARVLIYN QRQGHFPRVTTVSEGTRRENMDFSISISNITPADAGTYCYCIKFRKGSPDT EFKSGAGTELSVRAKPS
26		EEEVQIIQPDKSVSVAAGESVILHCTITSLTPVGPIQWFRGAGPARLLIYNQ REGPFPRVTTVSETTRRENMDFSISISNITPADAGTYCYCVKLKRGSPDTE FKSGAGTELSVRAKPS
27		EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLSPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ RQGPFPRVTTVSEGTKRENMDFSISISNITPADAGTYCYIKLRKGSPDTE FKSGAGTELSVRAKPS
28		EEEIQVIQPDKSVSVAAGESVIIHCTVTSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYN QRQGRFPRVTTVSEGTKRENMDFSISISNITPADAGTYCYCVKVRKGSPDT EVKSGAGTELSVRAKPS
29		EEEVQIIQPDKSVSVAAGESIILHCTVTSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYN QREGRFPRVTTVSEGTRRENMDFSISISNITPADAGTYCYIKLRKGSPDT EFKSGAGTELSVRAKPS
30		EEEVQLIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYN QREGPFPRVTTVSEGTKRENMDFSISISNITPADAGTYCYIKFRKGSPDTE VKSGAGTELSVRAKPS
31		EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYN QRQGPFPVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPS
32		EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARLLIYNQ RQGPFPRVTTVSETTKRENMDFSISISNITPADAGTYCYCVKFRKGSPDTE FKSGAGTELSVRAKPS
33		EEEVQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYN QKQGPFPVTTTSETTRRENMDFSISISNITPADAGTYCYIKFRKGSPDTE FKSGAGTELSVRAKPS

SEQ N°	ID	Secuencia
34		EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLTPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ RQGPFPRTTVSEGTRENNMDFSSISNITPADAGTYCYKFRKGSPDTE VKSGAGTELSVRAKPS

Las construcciones de las variantes de la SIRP- α de la invención deseablemente se unen con mayor afinidad a la CD47 bajo las condiciones características de un sitio de enfermedad, tal como un sitio de cáncer, por ejemplo, en el interior de un tumor, antes que bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo, pH neutro y una concentración de oxígeno adecuada). Las condiciones características de un sitio de enfermedad, tal como un sitio de cáncer, por ejemplo, en el interior de un tumor, comprenden, por ejemplo, pH ácido e hipoxia. En algunas formas de realización, las construcciones de las variantes de la SIRP- α de la invención se pueden modificar para que se unan preferencialmente a las células enfermas antes que a las células no enfermas. En particular, la células enfermas pueden ser las células cancerosas de una enfermedad por cáncer, por ejemplo, un cáncer de tumor sólido o hematológico. Preferiblemente, las construcciones de las variantes de la SIRP- α se unen con mayor afinidad a la CD47 en un pH ácido (por ejemplo, menos de alrededor de pH 7) que en pH neutro, por ejemplo, pH 7,4. Preferiblemente, las construcciones de las variantes de la SIRP- α se unen con mayor afinidad a una CD47 bajo condiciones hipóxicas que bajo una condición de concentración de oxígeno adecuada. En algunas formas de realización, una construcción de la variante de SIRP- α incluye una variante de la SIRP- α unida a un péptido bloqueante. En algunas formas de realización, la unión preferencial de la variante de SIRP- α en la construcción de la variante de SIRP- α a la CD47

presente sobre células enfermas o sitios de enfermedad se puede lograr mediante la unión del péptido bloqueante a la variante de SIRP- α mediante el uso de un conector clivable, que es clivado en las células enfermas o en los sitios de enfermedad. En algunas formas de realización, la unión preferencial de la variante de SIRP- α en la construcción de la variante de SIRP- α a la CD47 presente sobre células enfermas o en sitios de enfermedad se puede lograr mediante la unión del péptido de bloqueo a la variante de SIRP- α , en donde el péptido bloqueante se puede desprender o simplemente disociar de la variante de SIRP- α en las células enfermas o en los sitios de enfermedad.

En algunas formas de realización, una construcción de la variante de SIRP- α incluye una variante de la SIRP- α y un péptido bloqueante. En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α se puede unir a un péptido bloqueante a través de un conector (por ejemplo, un conector clivable). El péptido bloqueante sirve para bloquear el sitio de unión a CD47 de la variante de SIRP- α a fin de impedir la unión de la variante de SIRP- α a CD47 bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo, pH neutro y una concentración de oxígeno adecuada). El conector clivable es un conector que solamente se puede clivar bajo las condiciones características de un sitio de enfermedad (tal como un sitio de cáncer, por ejemplo, en el interior de un tumor), tal como un pH ácido e hipoxia. En algunas formas de realización, el conector clivable es clivado por un proteasa asociada al tumor en un sitio de enfermedad. En algunas formas de realización, no se cliva el conector y el péptido bloqueante simplemente se disocia de la variante de SIRP- α en un sitio de enfermedad de modo tal que la variante de SIRP- α queda libre para unirse a una CD47 cercana presente sobre células enfermas, por ejemplo, células tumorales. Por

consiguiente, sólo cuando la variante de SIRP- α está en un sitio de enfermedad será liberado del péptido bloqueante y quedará libre para unirse a una CD47 cercana presente sobre células enfermas, por ejemplo, células tumorales. Los péptidos bloqueantes y los conectores (por ejemplo, conectores clivables) se describirán con más detalle en la presente.

En algunas formas de realización, una construcción de la variante de SIRP- α incluye una variante de la SIRP- α y un grupo de direccionamiento. En algunas formas de realización, una variante de la SIRP- α se puede unir a un grupo de direccionamiento, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo específico del tumor, o a otra proteína o péptido, por ejemplo, un péptido de unión al anticuerpo, que tenga afinidad de unión por una célula enferma. Después de la administración, el anticuerpo específico del tumor o el péptido de unión al anticuerpo sirve como un grupo de direccionamiento para llevar la variante de SIRP- α hasta el sitio de enfermedad, tal como un sitio de cáncer, por ejemplo, en el interior de un tumor sólido, donde la SIRP- α puede interactuar específicamente con la CD47 presente sobre las células enfermas. En algunas formas de realización, se puede fusionar una variante de la SIRP- α con una proteína o un péptido, por ejemplo, un péptido de unión al anticuerpo capaz de unirse a un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo específico del tumor), es decir, de unirse a una región constante o variable del anticuerpo. Las variantes de SIRP- α que se pueden unir a uno o más anticuerpos se describirán con mayor detalle en la presente. En otras formas de realización, se pueden unir otras variantes de la SIRP- α , tales como las que se describen en la publicación Internacional N°: WO2013109752 (incorporada en la presente a modo de referencia), a un anticuerpo específico del tumor o a una proteína o un

péptido, por ejemplo, un péptido de unión al anticuerpo capaz de unirse a un anticuerpo específico del tumor. En algunas formas de realización, la variante de SIRP- α se puede unir al anticuerpo ya sea *in vitro* (antes de la administración a un humano) o *in vivo* (después de la administración).

En algunas formas de realización, una variante de la SIRP- α puede incluir además un dominio D2 y/o D3 de una SIRP- α de tipo salvaje humana. En algunas formas de realización, la variante de la SIRP- α se puede unir a un monómero del dominio Fc, una albúmina de suero humana (HSA), una proteína o péptido de unión en suero o una molécula orgánica, por ejemplo, un polímero (por ejemplo, un polietilenglicol (PEG)), a fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas de la variante de SIRP- α , por ejemplo, para aumentar la vida media en suero. Los monómeros del dominio Fc, las proteínas HSA, las proteínas o los péptidos de unión en suero y las moléculas orgánicas, tal como un PEG, que sirven para aumentar la vida media en suero de las variantes de SIRP- α de la invención se describirán con más detalle en la presente. En algunas formas de realización, una variante de la SIRP- α no incluye la secuencia de ninguna de las SEQ ID N°: 3-12 y 24-34.

II. Sustituciones de aminoácidos por residuos de histidina en las variantes de SIRP- α

En algunas formas de realización, además de las sustituciones de aminoácidos en una variante de la SIRP- α que se enumeran en la Tabla 2, la variante de SIRP- α puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos por residuos de histidina. Las construcciones de las variantes de la SIRP- α que incluyen una variante de la SIRP- α se unen con mayor afinidad a la CD47 presente sobre células enfermas o en un sitio de enfermedad que sobre células

no enfermas y bajo condiciones característica de un sitio de enfermedad (por ejemplo, pH ácido, hipoxia) antes que en condiciones fisiológicas. Los residuos de aminoácidos que serán sustituidos por residuos de histidina se pueden identificar usando métodos de mutagénesis por barrido de histidina, estructuras cristalinas de proteínas y diseño y modelación por computadora. Las técnicas y los métodos que se pueden usar para generar las variantes de SIRP- α y las maneras para determinar sus afinidades de unión a la CD47 presente sobre células enfermas y no enfermas se describirán con más detalle en la presente. Las sustituciones por el residuo de histidina se pueden ubicar en la interfase de una variante de la SIRP- α y la CD47 o se pueden encontrar en las regiones internas de una variante de la SIRP- α . Las sustituciones por el residuo de histidina se ubican preferencialmente en la interfase de una variante de la SIRP- α y la CD47. En la Tabla 4 se enumeran los aminoácidos específicos de la SIRP- α que se pueden sustituir por residuos de histidina. La numeración de los aminoácidos en la Tabla 4 es relativa a la secuencia de la SEQ ID N°: 3; también se puede sustituir uno o más aminoácidos en las correspondientes posiciones en cualquiera de las secuencias de las SEQ ID N°: 4-12 por residuos de histidina. Los residuos de contacto son los aminoácidos ubicados en la interfase de una variante de la SIRP- α y la CD47. Los residuos centrales son los aminoácidos internos que no están involucrados directamente en la unión entre una variante de la SIRP- α y la CD47. Las variantes de SIRP- α pueden incluir una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc. o todas) las sustituciones enumeradas en la Tabla 4. Las variantes de SIRP- α pueden contener un máximo de 20 sustituciones de histidina.

Tabla 4. Sustituciones de aminoácidos en la SIRP- α (la numeración de aminoácidos es relativa a la secuencia de la SEQ ID N°: 3)

Residuos de contacto	S29H, L30H, I31H, P32H, V33H, G34H, P35H, Q52H, K53H, E54H, L66H, T67H, K68H, R69H, F74H, K93H, K96H, G97H, S98H, D100H
Residuos centrales	L4H, V6H, A27H, I36H, F39H, E47H, L48H, I49H, Y50H, F57H, V60H, M72H, F74H, I76H, V92H, F94H, E103H

III. Unión dependiente del pH

Se ha demostrado en estudios que el metabolismo oncogénico mediado por células tumorales genera una gran cantidad de ácido láctico y protones, lo que conduce a una reducción en los valores de pH extracelulares hasta tanto como 6 en el tejido tumoral (Icard y col., *Biochim. Biophys. Acta.* 1826: 423-433, 2012). En algunas formas de realización, las construcciones de las variantes de la SIRP- α que incluyen una variante de la SIRP- α se modifican para que se unan con gran afinidad a la CD47 en un pH ácido antes que en un pH neutro (por ejemplo, de alrededor de pH 7,4). Por lo tanto, las construcciones de las variantes de la SIRP- α de la invención se modifican para que se unan selectivamente a la CD47 presente sobre células enfermas (por ejemplo, células tumorales) o sobre las células en un sitio de enfermedad (por ejemplo, las células en el microentorno del tumor que soporta el crecimiento tumoral), antes que a la CD47 presente sobre las células no enfermas.

En una forma de realización, para modificar la unión dependiente del pH de una construcción de la variante de SIRP- α de la invención, se puede conducir una mutagénesis con histidina con la variante de SIRP- α , en especial en la región de SIRP- α que interactúa con CD47. Se pueden utilizar las estructuras cristalinas de un complejo de SIRP- α y CD47 (véase, por ejemplo,

PDB ID N°: 2JJS) y modelación por computadora para visualizar el sitio de unión tridimensional de SIRP- α y CD47. Los métodos de diseño y modelación por computadora que son de utilidad para diseñar una proteína con propiedades de unión sensibles al pH son conocidos en la literatura y se describen, por ejemplo, en Strauch y col., *Proc Natl Acad Sci* 111: 675-80, 2014, que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia. En algunas formas de realización, se puede usar modelación por computadora para identificar los residuos de contacto clave en la interfase de SIRP- α y CD47. Los residuos de contacto clave identificados se pueden sustituir por residuos de histidina usando un software para diseño de proteínas disponible (por ejemplo, RosettaDesign), que permite generar varios diseños de proteínas que pueden ser optimizadas, filtradas y calificadas basado en la energía de unión y la complementariedad de formas computadas. Por lo tanto, se pueden identificar sustituciones por histidina energéticamente favorables en determinadas posiciones de aminoácido usando los métodos de diseño por computadora. La modelación por computadora también se puede usar para predecir el cambio en la estructura tridimensional de SIRP- α . Se pueden evitar las sustituciones de histidina que generan un cambio significativo en la estructura tridimensional de SIRP- α .

Una vez identificadas las sustituciones de aminoácidos energéticamente y estructuralmente óptimas, los aminoácidos se pueden sustituir sistemáticamente por residuos de histidina. En algunas formas de realización, se puede sustituir uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc, con un máximo de 20) aminoácidos de SIRP- α por residuos de histidina. En particular, se pueden sustituir los aminoácidos

ubicados en la interfase de SIRP- α y CD47, preferiblemente, los aminoácidos involucrados directamente en la unión de SIRP- α a CD47, por residuos de histidina. La variante de SIRP- α puede incluir una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc, con un máximo de 20) sustituciones de residuos de histidina. En otras formas de realización, los residuos de histidina naturales de SIRP- α se pueden sustituir por otros residuos de aminoácidos. En aún otras formas de realización, se pueden sustituir uno o más aminoácidos de SIRP- α por residuos que no son histidina a fin de afectar la unión con CD47 de los residuos de histidina naturales o sustituidos. Por ejemplo, la sustitución de los aminoácidos que rodean a un residuo de histidina natural por otros aminoácidos puede “enterrar” el residuo de histidina natural. En algunas formas de realización, también se pueden sustituir los aminoácidos que no están involucrados directamente en la unión con CD47, es decir, los aminoácidos internos (por ejemplo, los aminoácidos ubicados en el centro de la SIRP- α) por residuos de histidina. En la Tabla 4 se enumeran los aminoácidos específicos de la SIRP- α que se pueden sustituir por residuos de histidina o residuos que no son histidina. Los residuos de contacto son los aminoácidos ubicados en la interfase de SIRP- α y CD47. Los residuos centrales son los aminoácidos internos que no están involucrados directamente en la unión entre la SIRP- α y la CD47. Las variantes de SIRP- α pueden incluir una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc. o todas) las sustituciones enumeradas en la Tabla 4.

Las variantes de SIRP- α que contienen una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc, con un número máximo de 20) sustituciones de residuos de histidina pueden ser evaluadas por

su unión a CD47 bajo diferentes condiciones de pH (por ejemplo, a pH 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,4, 8). En algunas formas de realización, se puede usar una proteína CD47 purificada para evaluar la unión. Se pueden emplear varias técnicas conocidas por los especialistas en el arte para medir la constante de afinidad (K_A) o la constante de disociación (K_D) de una variante del complejo de SIRP- α /CD47 bajo diferentes condiciones de pH (por ejemplo, a pH 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,4, 8). En una forma de realización preferida, la afinidad de unión de una variante de la SIRP- α a una CD47 se puede determinar usando resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, con el sistema de resonancia de plasmón superficial (SPR) Biacore3000™, Biacore, INC, Piscataway N.J.). En un ejemplo de una forma de realización, una variante de la SIRP- α con unión dependiente del pH, que se une específicamente a la CD47 con mayor afinidad a pH 6 que a pH 7,4, presenta una menor K_D a pH 6 que a pH 7,4.

IV. Unión dependiente de hipoxia

La hipoxia del tumor es la condición en la cual las células tumorales han sido privadas de oxígeno. A medida que crece el tumor, su suministro de sangre es redirigido de manera constante a las partes de crecimiento más rápido del tumor, dejando porciones del tumor con una concentración de oxígeno significativamente menor que en los tejidos sanos.

En algunas formas de realización, se puede unir una variante de la SIRP- α a un fármaco activado por hipoxia, cuya acción permitirá aumentar la eficacia de una variante de SIRP-alfa contra las células enfermas relevantes bajo condiciones específicamente hipóxicas. Los profármacos activados por hipoxia son conocidos en la literatura, tales como los que fueron descritos por Kling y col., (*Nature Biotechnology*, 30: 381, 2012), incorporada en la presente

a modo de referencia.

V. Unión a anticuerpos

Otra estrategia para proporcionar una actividad selectiva de la SIRP- α en un sitio de enfermedad antes que en un sitio no enfermo consiste en unir la proteína SIRP- α a una proteína o un péptido que se pueda unir a una región de un anticuerpo. Preferiblemente, el anticuerpo es específico de una célula enferma, por ejemplo, una célula tumoral. Por ejemplo, el anticuerpo se puede unir específicamente a una proteína de la superficie celular presente sobre una célula enferma, por ejemplo, una célula tumoral. La proteína SIRP- α se puede unir al anticuerpo de manera reversible o irreversible.

Unión a anticuerpos en general

En algunas formas de realización, para modificar una proteína SIRP- α que se puede unir a diferentes anticuerpos independientemente de la especificidad del anticuerpo, la proteína SIRP- α se puede fusionar con una proteína o un péptido que reconoce la región constante de un anticuerpo, por ejemplo, el dominio constante C_{H2} o C_{H3} del dominio Fc de un anticuerpo. Una proteína SIRP- α se puede unir a CD47 y tiene por lo menos un 50% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de una SIRP- α de tipo salvaje (por ejemplo, la variante 1 (SEQ ID N°: 1, que se muestra a continuación)) o con una secuencia de una porción de unión a CD47 de una SIRP- α de tipo salvaje (por ejemplo, una secuencia de cualquiera de las SEQ ID N°: 3-12 enumeradas en la Tabla 1).

SEQ ID N°: 1

```
1  MEPAGPAPGR    LGPLLCLLLA    ASCAWSGVAG    EEELQVIQPD
KSVLVAAGET ATLRCTATSL
```

61 IPVGPIQWFR GAGPGRELIY NQKEGHFPRV TTVSDLTKRN
 NMDFSIRIGN ITPADAGTYT
 121 CVKFRKGSPD DVEFKSGAGT ELSVRAKPSA PVVSGPAARA
 TPQHTVSFTC ESHGFSPRDI
 181 TLKWFKNONE LSDFQTNVDP VGESVSYSIH STAKVVLTRE
 DVHSQVICEV AHVTLQGDPL
 241 RGTANLSETI RVPPTLEVTQ QPVRANQVN VTCQVRKFYP
 QRLQLTWLEN GNVSRTEAS
 301 TVTENKDGTY NWMSWLLNVN SAHRDDVKLT CQVEHDGQPA
 VSKSHDLKVS AHPKEQGSNT
 361 AAENTGSNER NIYIVGVVC TLLVALLMAA LYLVRIRQKK
 AQGSTSSTRL HEPEKNAREI
 421 TQDTNDIDADA DLNLPKGKKP APQAAEPNNH TEYASIQTSP
 QPASEDTLTY ADLDMVHLNR
 481 TPKQPAPKPE PSFSEYASVQ VPRK

Una porción de unión a CD47 de la SIRP- α de tipo salvaje incluye el dominio D1 de una SIRP- α de tipo salvaje (por ejemplo, una secuencia de cualquiera de las SEQ ID N°: 3-12 enumeradas en la Tabla 1). Las proteínas y los péptidos que presentan una unión general a la región constante de un anticuerpo son conocidos en el arte. Por ejemplo, las proteínas de unión a anticuerpos bacterianos, por ejemplo, las proteínas A, G y L, se unen a las regiones constantes de un anticuerpo. Las proteínas A y G se unen a los dominios Fc, en tanto la proteína L se une a la región constante de la cadena liviana. En un ejemplo de una forma de realización, la proteína A, G o L se puede fusionar con el extremo N o C terminal de una proteína SIRP- α .

Preferiblemente, en esta forma de realización, la proteína de fusión de la proteína A, G o L y la proteína SIRP- α se puede unir, es decir, mediante conjugación química, a un anticuerpo antes de la administración para impedir la unión de la proteína de fusión a varios otros anticuerpos en el suero. La proteína A, G o L también se puede desarrollar y seleccionar usando técnicas convencionales en el campo (es decir, evolución dirigida y bibliotecas de expresión) para una mayor afinidad de unión con las regiones constantes de un anticuerpo. En algunas formas de realización, la proteína SIRP- α se puede unir directamente a un anticuerpo usando las técnicas convencionales en el arte de conjugación genética o química. En otras formas de realización, la proteína SIRP- α también se puede unir a un anticuerpo por medio de un espaciador, lo que permite una flexibilidad estructural y espacial adicional de la proteína. En la presente se describirán con más detalle varios espaciadores. En algunas formas de realización, la proteína SIRP- α se puede unir, ya sea directamente o por medio de una proteína o un péptido de unión a anticuerpos, al anticuerpo de manera reversible o irreversible. Además, la selección de anticuerpos modificados que se pueden utilizar de acuerdo con las formas de realización de la invención que se describen en la presente se puede llevar a cabo como se describe, por ejemplo, en la publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 20100189651.

Otras proteínas o péptidos que se pueden unir a una región constante de un anticuerpo y los métodos para seleccionar dichas proteínas o péptidos se describen en la publicación de Patente de los EE.UU. N°: US20120283408, que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

Unión a anticuerpos específicos

En algunas formas de realización, para proporcionar un direccionamiento selectivo de las variantes de SIRP- α en un sitio de enfermedad y para modificar una variante de la SIRP- α capaz de unirse a un anticuerpo específico, por ejemplo, un anticuerpo específico del tumor, la construcción de la variante de SIRP- α puede incluir una variante de la SIRP- α y una proteína o un péptido específico del anticuerpo. La variante de SIRP- α se puede fusionar con una proteína o un péptido específico del anticuerpo (por ejemplo, un péptido de unión al anticuerpo). Preferiblemente, la proteína o el péptido se une específicamente a un anticuerpo específico del tumor. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de la variante de SIRP- α y la proteína o el péptido de unión al anticuerpo se puede coadministrar con el anticuerpo específico del tumor en una terapia combinada. En otras formas de realización, la proteína de fusión y el anticuerpo específico del tumor se pueden administrar por separado, es decir, separados por algunas horas entre sí, y preferiblemente el anticuerpo se administra primero. En aún otras formas de realización, antes de la administración, la proteína de fusión se puede unir de manera covalente al anticuerpo específico del tumor usando los métodos genéticos o químicos conocidos comúnmente en el arte.

Los ejemplos de péptidos de unión a anticuerpos incluyen un péptido de localización de enfermedad (DLP) (SEQ ID N°: 64 ó 65), un péptido pequeño que se puede unir al centro del fragmento de la región de unión al antígeno (Fab) de Cetuximab (véase, por ejemplo, Donaldson y col., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 17456-17461, 2013). Cetuximab es un anticuerpo de IgG1 anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Los péptidos de unión a anticuerpos que se pueden fusionar con una variante de la SIRP- α también

incluyen, pero en un sentido no taxativo, los péptidos que tienen por lo menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia del DLP (SEQ ID N°: 64 ó 65) o un fragmento del mismo. En algunas formas de realización, el péptido de unión al anticuerpo tiene la secuencia de la SEQ ID N°: 64.

En un estudio reciente, se mostró que la SIRP- α mejora la fagocitosis *in vitro* de células DLD-1 en combinación con el anticuerpo Cetuximab (Weiskopf y col., *Science* 341: 88-91, 2013). En algunas formas de realización, la variante de la SIRP- α se puede fusionar con un péptido de unión al anticuerpo específico, por ejemplo, un DLP cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 64. En estas formas de realización, la construcción de la variante de SIRP- α que incluye una variante de la SIRP- α y un DLP puede ejercer su actividad en tumores que expresan EGFR unido a Cetuximab. Esto a su vez puede mejorar aún más la administración de la construcción de la variante de SIRP- α que incluye una variante de la SIRP- α y DLP y Cetuximab a pacientes que responden a un anti-EGFR. Un ejemplo de una construcción de la variante de SIRP- α que incluye una variante de la SIRP- α y DLP se muestra en la SEQ ID N°: 66, donde la porción con subrayado simple indica el DLP y la porción resaltada en negritas indica la variante de SIRP- α . La secuencia de la variante de SIRP- α (porción resaltada en negritas) en la SEQ ID N°: 66 se puede reemplazar por la secuencia de cualquier variante de SIRP- α descrita en la presente. También se pueden fusionar otros péptidos de unión a anticuerpos a una variante de la SIRP- α . Dichos péptidos de unión a anticuerpos incluyen, pero en un sentido no taxativo, aquellos péptidos que se pueden unir específicamente a anticuerpos tales como cetuximab, pembrolizumab,

nivolumab, pidilizumab, MEDI0680, MEDI6469, Ipilimumab, tremelimumab, urelumab, vantictumab, varlilumab, mogamalizumab, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CS1, herceptina, trastuzumab y/o pertuzumab.

SEQ ID N°: 66

CQFDLSTRRLKCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQIIQPKSVLVAAG
ETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKRNN
MDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPPDVEFKSGAGTELSVRAKPSGGGG
 SGGGGSGGGGSGGGGSCQFDLSTRRLKC

En algunas formas de realización, la construcción de la variante de SIRP- α que incluye una variante de la SIRP- α y un DLP también se puede combinar con un péptido bloqueante basado en CD47 descrito en la presente para bloquear la unión de la variante de SIRP- α presente en la construcción antes que la construcción llegue al sitio de enfermedad donde el conector clivable se puede clivar. En estas formas de realización, se puede ampliar la ventana terapéutica ya que la construcción de la variante de SIRP- α que contiene una variante de la SIRP- α , un péptido bloqueante basado en CD47 y un DLP se acumula en el sitio de enfermedad y sólo es activa en el sitio de enfermedad después del clivaje del conector inducido por una proteasa (por ejemplo, una proteasa específica del tumor) u otras características del sitio de enfermedad (por ejemplo, pH ácido, hipoxia).

En algunas formas de realización, las proteínas o los péptidos que se pueden unir a anticuerpos específicos del tumor se pueden identificar usando las técnicas usadas comúnmente en el arte, como por ejemplo evolución dirigida y bibliotecas de expresión, por ejemplo, una biblioteca de expresión en

fagos. Los métodos y las técnicas dirigidas para identificar proteínas y péptidos capaces de unirse a los anticuerpos específicos de tumores son conocidos en el arte, tales como los que fueron descritos por Donaldson y col., (*Proc Natl Acad Sci* 110: 17456-61, 2013), que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia. En una biblioteca de expresión en fagos, la proteína o el péptido específico del anticuerpo potencial típicamente se une de manera covalente a una proteína de recubrimiento de bacteriófagos. La unión es el resultado de la traducción de un ácido nucleico que codifica la proteína o el péptido fusionado a la proteína de recubrimiento. El bacteriófago que expresa el péptido se puede cultivar y cosechar usando métodos estándar de preparación de fagos, por ejemplo, precipitación con PEG a partir del medio de crecimiento. Estos fagos de expresión se pueden seleccionar luego contra otras proteínas, por ejemplo, anticuerpos específicos de tumores, a fin de detectar la interacción entre la proteína expresada y los anticuerpos específicos de tumores. Una vez identificada la proteína o el péptido específico del tumor, se puede aislar el ácido nucleico que codifica la proteína o el péptido específico del tumor seleccionado a partir de células infectadas con los fagos seleccionados o de los propios fagos, después de la amplificación. Se pueden repicar colonias o placas individuales y luego se puede aislar y secuenciar el ácido nucleico. Después de identificar y aislar la proteína o el péptido específico del anticuerpo, la proteína o el péptido se puede fusionar con el extremo N o C terminal de una variante de la SIRP- α . En algunas formas de realización, la variante de la SIRP- α se puede unir directamente a un anticuerpo específico del tumor usando las técnicas convencionales en el arte de la conjugación genética o química. En otras formas de realización, la

variante de la SIRP- α también se puede unir a un anticuerpo específico del tumor por medio de un espaciador, lo que permite una flexibilidad estructural y espacial adicional de la proteína. En la presente se describirán con más detalle varios espaciadores. En algunas formas de realización, la variante de la SIRP- α se puede unir, ya sea directamente o por medio de una proteína o un péptido de unión a anticuerpos, al anticuerpo de manera reversible o irreversible.

En otras formas de realización, la SIRP- α de tipo salvaje o el dominio D1 extracelular de la SIRP- α de tipo salvaje (por ejemplo, una secuencia de cualquiera de las SEQ ID N°: 3-12 enumeradas en la Tabla 1) se puede unir a un anticuerpo específico del tumor. Preferiblemente, el dominio D1 de SIRP- α está unido al anticuerpo específico del tumor. El anticuerpo específico del tumor sirve como un grupo de direccionamiento para llevar la SIRP- α de tipo salvaje o el dominio D1 al sitio de enfermedad, por ejemplo, un sitio de cáncer, por ejemplo, en el interior de un tumor sólido, donde la SIRP- α de tipo salvaje o el dominio D1 puede interactuar con la CD47 presente sobre las células enfermas. En algunas formas de realización, una SIRP- α de tipo salvaje o el dominio D1 extracelular de la SIRP- α de tipo salvaje se puede unir directamente a un anticuerpo específico del tumor usando las técnicas convencionales en el arte de conjugación genética o química. En otras formas de realización, una SIRP- α de tipo salvaje o el dominio D1 extracelular de la SIRP- α de tipo salvaje también se puede unir a un anticuerpo específico del tumor por medio de un espaciador, lo que permite una flexibilidad estructural y espacial adicional de la proteína. En la presente se describirán con más detalle varios espaciadores. En otras formas de realización, una SIRP- α de tipo salvaje o el dominio D1 extracelular de la SIRP- α de tipo salvaje se puede fusionar con

la proteína o el péptido capaces de unirse a un anticuerpo específico del tumor mencionados precedentemente. En aún otras formas de realización, se pueden unir otros polipéptidos SIRP- α , tales como los que se describen en la publicación Internacional N°: WO2013109752 (incorporada en la presente a modo de referencia), a un anticuerpo específico del tumor o a una proteína o un péptido capaz de unirse a un anticuerpo específico del tumor. En algunas formas de realización, la SIRP- α de tipo salvaje o el dominio D1 se puede unir, ya sea directamente o por medio de una proteína o un péptido de unión a anticuerpos, al anticuerpo de manera reversible o irreversible..

VI. Péptidos bloqueantes

Un péptido bloqueante puede unirse a una variante de SIRP- α mediante un conector clivable. En algunas formas de realización, un péptido bloqueante también puede unirse no covalentemente a una variante de SIRP- α . El péptido bloqueante actúa como para bloquear el sitio de unión a CD47 de la variante de SIRP- α tal que la variante de SIRP- α no puede unirse a CD47 en la superficie celular de células no enfermas en condiciones fisiológicas (por ejemplo, pH neutro y concentración de oxígeno adecuada). En condiciones anormales (es decir, un ambiente ácido y/o hipóxico o un ambiente con expresión de proteasa aumentada) en un sitio de la enfermedad, tal como un sitio de cáncer, por ejemplo, dentro de un tumor, el conector clivable puede ser clivado para liberar la variante de SIRP- α del péptido bloqueante. La variante de SIRP- α entonces estaría libre entonces para unirse a CD47 en células tumorales cercanas. Los ejemplos de conectores clivables se describen con mayor detalle en la presente.

En algunas formas de realización, el péptido bloqueante tiene mayor afinidad por SIRP- α de tipo salvaje que por la variante de SIRP- α diseñada. Una vez que se cliva el conector, el péptido bloqueante se disocia de la variante de SIRP- α y puede unirse a SIRP- α de tipo salvaje. Pueden identificarse péptidos bloqueantes con diferentes afinidades de unión por SIRP- α de tipo salvaje y variante de SIRP- α usando métodos y técnicas comúnmente conocidas en el arte, por ejemplo, evolución dirigida y bibliotecas de presentación (por ejemplo, presentación en fagos o levaduras). En una forma de realización ejemplificativa, un nucleótido que codifica para la región de unión a SIRP- α de CD47 o un nucleótido que codifica para la región variable de un anticuerpo anti-SIRP- α puede mutarse y/o recombinarse al azar para crear una gran biblioteca de variantes de genes usando técnicas tales como, por ejemplo, PCR propensa a error y entremezclado de ADN. Una vez que se creó la biblioteca genética, los péptidos mutantes codificados por los nucleótidos pueden cribarse respecto a su capacidad de unirse a SIRP- α de tipo salvaje y variante de SIRP- α usando, por ejemplo, presentación en fagos o levaduras. Los péptidos identificados que pueden unirse a SIRP- α de tipo salvaje y a la variante de SIRP- α pueden someterse a un segundo proceso de cribado tal que pueden aislarse las proteínas que se unen con mayor afinidad a SIRP- α de tipo salvaje que a la variante de SIRP- α . Los péptidos identificados, una vez unidos a SIRP- α de tipo salvaje o a la variante de SIRP- α deberían prevenir la unión de CD47 a SIRP- α de tipo salvaje o a la variante de SIRP- α . Pueden usarse diferentes técnicas conocidas por aquellos con experiencia en el arte para medir la constante de afinidad (K_A) o constante de disociación (K_D) de un complejo de variante de SIRP- α /péptido bloqueante o un complejo de SIRP- α

de tipo salvaje/péptido bloqueante. Un péptido bloqueante puede unirse con por lo menos una afinidad tres veces mayor a una SIRP- α de tipo salvaje respecto a una variante de SIRP- α .

Péptidos bloqueantes basados en CD47

Un péptido bloqueante puede ser un polipéptido mimético de CD47, o un fragmento de CD47 que puede unirse a una variante de SIRP- α descrito en la presente. Algunos péptidos bloqueantes pueden unirse a una variante de SIRP- α en un sitio que es diferente al sitio de unión a CD47. Algunos péptidos bloqueantes pueden unir una variante de SIRP- α de una manera que es diferente de CD47. En algunos casos, el péptido bloqueante puede comprender por lo menos un enlace disulfuro estabilizante. Un péptido bloqueante puede comprender una secuencia polipeptídica de CERVIGTGWRC, o un fragmento o variante del mismo. Un péptido bloqueante variante puede contener una o más modificaciones conservativas o no conservativas. En algunos casos un péptido bloqueante variante puede contener modificaciones de una cisteína a una serina y/o una o más modificaciones de una asparagina por una glutamina. Un péptido bloqueante puede unirse a la variante de SIRP- α en el mismo sitio que un péptido que comprende una secuencia polipeptídica de CERVIGTGWRC, o una variante o fragmento de la misma. Un péptido bloqueante puede comprender una secuencia polipeptídica de GNYTCEVTELTREGETIIEELK, o un fragmento o variante de la misma. Un péptido bloqueante puede unirse a la variante de SIRP- α en el mismo sitio que un péptido que comprende una secuencia polipeptídica de GNYTCEVTELTREGETIIEELK, o una variante o fragmento de la misma. En

algunos casos un péptido bloqueante puede comprender una secuencia polipeptídica de EVTELTRERGE, o un fragmento o variante de la misma. Un péptido bloqueante puede unirse a la variante de SIRP- α en el mismo sitio que un péptido que comprende una secuencia polipeptídica de EVTELTRERGE, o una variante o fragmento de la misma. En algunos casos un péptido bloqueante puede comprender una secuencia polipeptídica de CEVTELTREGEC, o un fragmento o variante de la misma. Un péptido bloqueante puede unirse a la variante de SIRP- α en el mismo sitio que un péptido que comprende una secuencia polipeptídica de CEVTELTREGEC, o una variante o fragmento de la misma.

En la presente se proveen construcciones de variantes de SIRP- α que comprenden una variante de SIRP- α y un péptido bloqueante, en donde el péptido bloqueante puede comprender una secuencia polipeptídica de SEVTELTRGET, o un fragmento o variante de la misma. Un péptido bloqueante puede unirse a la variante de SIRP- α en el mismo sitio que un péptido que comprende una secuencia polipeptídica de SEVTELTRGET, o una variante o fragmento de la misma. En algunos casos, el péptido bloqueante puede comprender una secuencia polipeptídica de GQYTSEVTELTRGETIIEELK, o un fragmento o variante de la misma. Un péptido bloqueante puede unirse a la variante de SIRP- α en el mismo sitio que un péptido que comprende una secuencia polipeptídica de GQYTSEVTELTRGETIIEELK, o una variante o fragmento de la misma.

En algunos casos, el péptido bloqueante puede ser un polipéptido variante de CD47, que exhiben una afinidad mayor por SIRP- α de tipo salvaje, en comparación a la variante de SIRP- α . Cuando se compara con CD47 de tipo

salvaje, el polipéptido bloqueante puede comprender por lo menos una de las siguientes mutaciones: T102Q, T102H, L101Q, L101H y L101Y. En comparación a CD47 de tipo salvaje, el polipéptido bloqueante puede comprender una introducción de un residuo glicina adicional en o cerca del extremo N terminal. La glicina puede introducirse adyacente a una glutamina y/o una leucina en o cerca del extremo N terminal de CD47. En algunos casos, un péptido bloqueante puede ser un polipéptido variante de CD47 que demuestra una afinidad menor por una variante de SIRP- α en comparación con un CD47 de tipo salvaje. Dichos polipéptidos variantes de CD47 se identifican fácilmente y se ensayan usando métodos descritos en la presente.

En la presente se proveen construcciones de variantes de SIRP- α que comprende una variante de SIRP- α descrita en la presente, en donde la mencionada variante de SIRP- α está conectada a un péptido bloqueante descrito en la presente mediante el uso de por lo menos un conector. La variante de SIRP- α puede comprender el mismo sitio de unión a CD47 que una SIRP- α de tipo salvaje. La variante de SIRP- α puede comprender una o más mutaciones, o inserciones en comparación a una SIRP- α de tipo salvaje. La variante de SIRP- α puede ser una forma troncada de la SIRP- α de tipo salvaje. El péptido bloqueante puede ser un mimético, variante o fragmento de CD47 descrito en la presente. El péptido bloqueante puede exhibir una afinidad mayor por SIRP- α de tipo salvaje, en comparación con la variante de SIRP- α en la construcción de la variante de SIRP- α . El péptido bloqueante puede ser un polipéptido variante de CD47 que demuestra una menor afinidad por una variante de SIRP- α en comparación con CD47 de tipo salvaje. El conector puede ser por lo menos un conector que opcionalmente puede clivarse por una

o más proteasas y opcionalmente también comprende uno o más espaciadores. El conector clivable puede comprender la secuencia LSGRSDNH. Los espaciadores pueden comprender una o más unidades de espaciadores glicina-serina, en donde cada unidad de los mismos puede comprender la secuencia GGGGS.

En algunas formas de realización, el péptido bloqueante que está unido a una variante de SIRP- α a modo de a conector clivable es un péptido de unión a SIRP- α derivado de CD47 (es decir, un péptido bloqueante basado en CD47). En algunas formas de realización, el péptido bloqueante basado en CD47 deriva de la porción de unión a SIRP- α de CD47. La porción de unión a SIRP- α de CD47 también se refiere como el dominio de superfamilia de inmunoglobulina (IgSF) de CD47, cuya secuencia se muestra más adelante (SEQ ID NO: 35; Ref. NP_0017681).

SEQ ID NO: 35: dominio de IgSF de tipo salvaje de CD47 humano

```

1-50    QLLFNKTKSV    EFTFCNDTVV    IPCFVTNMEA    QNTTEVYVKW
KFKGRDIYTF

51-100  DGALNKSTVP    TDFSSAKIEV    SQLLKGDASL    KMDKSDAVSH
TGNYTCEVTE

101-123 LTREGETIIE    LKYRVVSWFS    PNE

```

En algunas formas de realización, el péptido bloqueante basado en CD47 contiene el dominio de IgSF de longitud completa de CD47 (SEQ ID NO: 35) o un fragmento del mismo. En algunas formas de realización, el péptido bloqueante basado en CD47 contiene una o más sustituciones, eliminaciones,

y/o adiciones de aminoácidos en relación a las adiciones relativas al dominio IgSF de tipo salvaje de CD47 (SEQ ID NO: 35) o un fragmento del mismo. En algunas formas de realización, un péptido bloqueante basado en CD47 tiene por lo menos 80% (por ejemplo, 83%, 86%, 90%, 93%, 96%, etc.) identidad de secuencia de aminoácido con la secuencia del dominio de IgSF de tipo salvaje de CD47 (SEQ ID NO: 35) o un fragmento del mismo.

En algunas formas de realización, las sustituciones, eliminaciones, y/o adiciones de aminoácidos en el péptido bloqueante basado en CD47 da como resultado el péptido bloqueante basado en CD47 que tiene baja afinidad de unión por una variante de SIRP- α y afinidad de unión relativamente alta por la SIRP- α de tipo salvaje. En algunas formas de realización, las sustituciones de aminoácidos en el péptido bloqueante basado en CD47 se localizan en la interfaz de CD47 y SIRP- α . Por ejemplo, la sustitución de aminoácido T102Q en el dominio IgSF de CD47 colisiona estéricamente con la sustitución de aminoácido A27I en una variante de SIRP- α , mientras que una SIRP- α de tipo salvaje que tiene A27 no colisionaría estéricamente con la sustitución de aminoácido T102Q (véase la Figura 2). Por lo tanto, un péptido bloqueante basado en CD47 que tiene T102Q no se uniría con mayor afinidad a una SIRP- α de tipo salvaje que tiene A27 respecto a una variante de SIRP- α que tiene A27I. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos en un péptido bloqueante basado en CD47 que pueden crear colisiones estéricas con aminoácidos específicos en una variante de SIRP- α se listan en la Tabla 5. Cada una de estas sustituciones de aminoácidos en un péptido bloqueante basado en CD47 puede reducir la afinidad de unión del péptido bloqueante basado en CD47 a

una variante de SIRP- α , dependiendo del aminoácido específico en la variante de SIRP- α en el sitio de interacción SIRP- α -CD47.

Tabla 5: Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos en un péptido bloqueante basado en CD47 que puede crear colisiones estéricas con aminoácidos específicos en una variante de SIRP- α

Sustitución de aminoácido en un péptido bloqueante basado en CD47 (la numeración de aminoácidos es relativa a SEQ ID NO: 35)	Aminoácido en una variante de SIRP- α (la numeración de aminoácidos es relativa a cualquiera de las SEQ ID NOs: 13-23)
T102Q	27I
T102H	27I
L101Q	31F
L101H	31F
L101Y	31F

Además de crear colisiones estéricas entre un péptido bloqueante basado en CD47 y una variante de SIRP- α , las sustituciones, adiciones, y/o eliminaciones de aminoácidos también pueden usarse para romper interacciones no covalentes específicas entre un péptido bloqueante basado en CD47 y una variante de SIRP- α , reduciendo, de esta manera, la afinidad de unión del péptido bloqueante basado en CD47 por la variante de SIRP- α . En algunas formas de realización, la extensión del extremo N terminal del péptido bloqueante basado en CD47 en uno o más aminoácidos (por ejemplo, un aminoácido), por agregado de uno o más aminoácidos directamente al extremo

N terminal y/o por inserción de uno o más aminoácidos entre otros aminoácidos en el extremo N terminal, rompe las interacciones no covalentes (por ejemplo, interacciones de enlace de hidrógeno) entre el extremo N terminal del péptido bloqueante basado en CD47 y una variante de SIRP- α . Por ejemplo, una adición de aminoácido, por ejemplo, una adición de glicina, en el extremo N terminal del péptido bloqueante basado en CD47 prevendrá la ciclización de glutamina a piroglutamato en el extremo N terminal y también creará contactos e interacciones no deseados que probablemente alterarán las interacciones de enlace de hidrógeno entre el piroglutamato N-terminal del péptido bloqueante basado en CD47 y el aminoácido L66 en una SIRP- α de tipo salvaje o sustitución de aminoácido L66T en una variante de SIRP- α (véase también el Ejemplo 5). En algunas formas de realización, un residuo aminoacídico, por ejemplo, glicina, se agrega al extremo N terminal del péptido bloqueante basado en CD47 tal que el extremo N terminal de CD47 se cambia de QLLFNK a GQLLFNK o QGLLFNK. La selección de las sustituciones, eliminaciones, y/o adiciones de aminoácidos en un péptido bloqueante basado en CD47 dependería de las sustituciones específicas de aminoácidos en una variante de SIRP- α .

Adicionalmente, la fusión del extremo N terminal del péptido bloqueante basado en CD47 al extremo C terminal de una variante de SIRP- α mediante un conector clivable y opcionalmente uno o más espaciadores también afecta las interacciones de unión entre el péptido bloqueante basado en CD47 y la variante de SIRP- α y reduce la afinidad de unión del péptido bloqueante basado en CD47 por la variante de SIRP- α . En algunas formas de realización, en una construcción de la variante de SIRP- α , el extremo N terminal de un

péptido bloqueante basado en CD47 se fusiona al extremo C terminal de una variante de SIRP- α mediante un conector clivable y opcionalmente uno o más espaciadores. En algunas formas de realización, en una construcción de la variante de SIRP- α , el extremo C terminal de un péptido bloqueante basado en CD47 se fusiona al extremo N terminal de una variante de SIRP- α mediante un conector clivable y opcionalmente uno o más espaciadores. Los Ejemplos de conectores clivables y los espaciadores se describen con mayor detalle más adelante en la presente.

Los péptidos bloqueantes basados en CD47 ejemplificativos se muestran en la Tabla 6. En algunas formas de realización, el péptido bloqueante basado en CD47 tiene o incluye la secuencia SEVTELTREGET (SEQ ID NO: 38). En algunas formas de realización, el péptido bloqueante basado en CD47 tiene o incluye la secuencia GQYTSEVTELTREGETIIEELK (SEQ ID NO: 40).

Tabla 6

SEQ ID NO	Péptidos bloqueantes basados en CD47	Porción del dominio IgSF de CD47
36	EVTELTREGE	aminoácidos 97-106 de la SEQ ID NO: 35
37	CEVTELTREGE C	aminoácidos 96-107 de la SEQ ID NO: 35 con T125C
38	SEVTELTREGET	aminoácidos 96-107 de la SEQ ID NO: 35 con C96S

SEQ ID NO	Péptidos bloqueantes basados en CD47	Porción del dominio IgSF de CD47
39	GNYTCEVTELTREGETIIE LK	aminoácidos 92-112 de la SEQ ID NO: 35
40	G Q YT S EVTELTREGETIIE LK	aminoácidos 92-112 de la SEQ ID NO: 35 con N93Q y C96S
41	QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SPLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE Q TREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	Dominio IgSF de CD47 con L101Q
42	QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SPLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE Y TREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	Dominio IgSF de CD47 con L101Y

SEQ ID NO	Péptidos bloqueantes basados en CD47	Porción del dominio IgSF de CD47
43	QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE H TREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	Dominio IgSF de CD47 con L101H
44	QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE L Q TREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	Dominio IgSF de CD47 con T102Q
45	QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE L H TREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	Dominio IgSF de CD47 con T102H

SEQ ID NO	Péptidos bloqueantes basados en CD47	Porción del dominio IgSF de CD47
46	GQLLFNKTCSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE LTREGETIIE LKYRVVSWFS PNE	Dominio IgSF de CD47 con agregado de glicina en extremo N terminal

VII. Conectores clivables

En algunas formas de realización, una construcción de la variante de SIRP- α incluye una variante de SIRP- α unida a un péptido bloqueante. En algunas formas de realización, una construcción de la variante de SIRP- α incluye una SIRP- α de tipo salvaje unida a un péptido bloqueante. Un conector usado para fusionar una variante de SIRP- α o una SIRP- α de tipo salvaje y un péptido bloqueante puede ser un conector clivable o un conector no clivable. En algunas formas de realización, la unión preferencial de la variante de SIRP- α en la construcción de la variante de SIRP- α a CD47 en células enfermas o sitios de enfermedad puede obtenerse por unión del péptido bloqueante a la variante de la SIRP- α mediante el uso de un conector clivable, que se cliva en las células enfermas o sitios de enfermedad.

En algunas formas de realización, se usa un conector clivable entre una variante de SIRP- α y un péptido bloqueante. En algunas formas de realización, puede instalarse un conector clivable en un péptido bloqueante, que puede

estar asociado no covalentemente con la variante de SIRP- α para bloquear la unión de la variante de SIRP- α a CD47 en condiciones fisiológicas. Bajo determinadas condiciones, puede clivarse un conector clivable. Si el conector clivable está dentro de un péptido bloqueante, el clivaje del conector podría inactivar el péptido bloqueante. En condiciones características de un sitio de enfermedad, tal como un sitio de cáncer, por ejemplo, dentro de un tumor, el conector se cliva para liberar la variante de SIRP- α del péptido bloqueante tal que la variante de SIRP- α puede unirse a CD47 cercanos en la superficie celular de las células enfermas, por ejemplo, células tumorales. De esta manera, en una construcción de SIRP- α que incluye una variante de SIRP- α y un péptido bloqueante, la variante de SIRP- α puede unirse solo a CD47 en las células enfermas (por ejemplo, células tumorales) o células en un sitio de enfermedad (por ejemplo, células en el microambiente del tumor que promueve el crecimiento del tumor) y no tiene la capacidad de unirse a CD47 en células no enfermas en condiciones fisiológicas, ya que el conector clivable permanece estable en condiciones fisiológicas y el sitio de unión a CD47 de la variante de SIRP- α podría ser bloqueado por el péptido bloqueante. Un conector clivable puede incluir aminoácidos, moléculas orgánicas pequeñas, o una combinación de aminoácidos y moléculas orgánicas pequeñas que clivan o inducen el clivaje del conector en condiciones características de un sitio de enfermedad, tal como pH ácido, hipoxia y expresión de proteínas aumentada. Los conectores clivables son estable en condiciones fisiológicas (por ejemplo, pH neutro y concentración de oxígeno adecuada). En algunas formas de realización, un conector clivable puede no ser clivado y el péptido bloqueante puede simplemente disociarse de la variante de SIRP- α en un sitio de enfermedad tal

que la variante de SIRP- α queda libre para unirse a CD47 cercanos en las células enfermas, por ejemplo, células tumorales. En estas formas de realización, las variantes de SIRP- α pueden diseñarse para tener unión dependiente del pH a CD47, cuyos detalles se describen precedentemente. Las variantes de SIRP- α pueden diseñarse para unirse con mayor afinidad a CD47 bajo el pH ácido de un sitio de enfermedad que bajo pH neutro (por ejemplo, alrededor de pH 7,4) de un sitio no enfermo. Por lo tanto, el péptido bloqueante (por ejemplo, un péptido bloqueante basado en CD-47 o una proteína bloqueante de dominio IgSF de CD47) puede disociarse de la variante de SIRP- α bajo el pH ácido de un sitio de enfermedad. En algunas formas de realización, para diseñar la unión dependiente del pH de una variante de SIRP- α a CD47 en el sitio de enfermedad, puede realizarse una mutagénesis de histidina en la SIRP- α , especialmente en la región de SIRP- α que interactúa con CD47.

Conectores clivables dependientes de pH

Una de las características de un sitio de cáncer, por ejemplo, dentro de un tumor, es el pH ácido. En algunas formas de realización, un conector puede clivarse bajo pH ácido (por ejemplo, menor de aproximadamente pH 7). Un conector sensible a ácido es estable a pH fisiológico (por ejemplo, alrededor de pH 7,4). El clivaje a pH ácido puede ser mediante hidrólisis ácida o por proteínas presentes y activas al pH ácido de un sitio de enfermedad, tal como un sitio de cáncer, por ejemplo, dentro de un tumor. Los conectores sensibles a ácido pueden incluir una porción, tal como un grupo o compuesto funcional, con capacidad de ser hidrolizado bajo pH ácido. Los grupos y compuestos

funcionales químicos sensibles a ácido incluyen, a título enunciativo no taxativo, por ejemplo, acetales, cetales, tiomaleamatos, hidrazonas y enlaces disulfuro. Los conectores sensibles a ácido, así como grupos y compuestos químicos sensibles a ácido, que pueden usarse en la construcción de conectores sensibles a ácido, son bien conocidos en el arte y se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 8.748.399, 5.306.809 y 5.505.931, Laurent y col., (*Bioconjugate Chem.* 21:5–13, 2010), Castaneda y col. (*Chem. Commun.* 49:8187-8189, 2013) y Ducry y col. (*Bioconjug. Chem.* 21:5-13, 2010), cada una de las cuales se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia. En una forma de realización, puede instalarse un enlace disulfuro en un conector clivable usando un sintetizador de péptidos y/o técnicas de síntesis química convencionales. En otra forma de realización, puede usarse un conector ácido tiomaleámico (Castaneda y col. *Chem. Commun.* 49:8187-8189, 2013) como el conector clivable. En esta forma de realización, para insertar un conector ácido tiomaleámico entre una variante de SIRP- α y un péptido bloqueante, uno de los dos grupos tioles del conector ácido tiomaleámico (véase, por ejemplo, Esquema 2, Castaneda y col.) puede unirse al extremo C terminal de una variante de SIRP- α , mientras que el grupo éster del conector tiomaleámico puede unirse al extremo N terminal del péptido bloqueante. Los contenidos de las publicaciones referidas se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia.

Conectores clivables dependientes de hipoxia

En algunas formas de realización, un conector puede clivarse en condiciones hipóxicas, que es otra característica de un sitio de cáncer, por

ejemplo, dentro de un tumor. Se previene que una variante de SIRP- α unida a un péptido bloqueante mediante un conector sensible a hipoxia se una a CD47 en células no enfermas mientras que el conector permanece estable en condiciones fisiológicas (por ejemplo, pH neutro y concentración de oxígeno adecuada). Una vez que la proteína de fusión se encuentra en el sitio del cáncer, por ejemplo, dentro de un tumor, en donde la concentración de oxígeno es significativamente menor que en los tejidos sanos, el conector se cliva para liberar la variante de SIRP- α del péptido bloqueante, que entonces puede unirse a CD47 en la superficie celular de células tumorales. El conector sensible a hipoxia puede incluir una porción, por ejemplo, un aminoácido o un grupo funcional químico, con capacidad de ser clivado en condiciones hipóxicas. Algunos ejemplos de porciones químicas que pueden ser clivadas, es decir, clivadas por reducción, en condiciones hipóxicas incluyen, a título enunciativo no taxativo, quinonas, N-óxidos y grupos nitro heteroaromáticos. Estas porciones químicas pueden instalarse en el conector clivable usando química convencional y técnicas de síntesis de péptidos. Los ejemplos de aminoácidos sensibles a hipoxia también son conocidos en el arte, tales como aquellos descritos por Shigenaga y col. (*European Journal of Chemical Biology* 13:968–971, 2012), que se incorpora en su totalidad a modo de referencia a la presente.

En una forma de realización preferida, el aminoácido sensible a hipoxia descrito por Shigenaga y col. (*European J. Chem, Biol.* 13:968–971, 2012) puede insertarse entre una variante de SIRP- α y un péptido bloqueante. Por ejemplo, el grupo amino del aminoácido sensible a hipoxia puede unirse al extremo C terminal de la variante de SIRP- α mediante un enlace peptídico y

similarmente, el grupo ácido carboxílico del aminoácido sensible a hipoxia puede unirse al extremo N terminal del péptido bloqueante mediante un enlace peptídico. En condiciones hipóxicas, la reducción del grupo nitro induce el clivaje del enlace peptídico entre el aminoácido sensible a hipoxia y el extremo N terminal del péptido bloqueante, por lo tanto, se libera exitosamente la variante de SIRP- α del péptido bloqueante. La variante de SIRP- α puede entonces unirse a CD47 en las células tumorales.

En otra forma de realización, el grupo 2-nitroimidazol sensible a hipoxia descrito por Duan y col. (*J. Med. Chem.* 51:2412–2420, 2008) puede insertarse entre una variante de SIRP- α y un péptido bloqueante o instalarse en un conector clivable insertado entre una variante de SIRP- α y un péptido bloqueante. En condiciones hipóxicas, la reducción del grupo nitro induce reducción adicional, que eventualmente lleva a la eliminación del grupo 2-nitroimidazol de su unión, por ejemplo, con la variante SIRP- α , el péptido bloqueante, o el conector clivable.

Conectores clivables dependientes de enzimas asociadas a tumor

En otras formas de realización, una construcción de la variante de SIRP- α puede incluir una variante de SIRP- α unida a un péptido bloqueante mediante un conector (por ejemplo, un conector clivable) y opcionalmente uno o más espaciadores (los ejemplos de espaciadores se describen con detalle más adelante en la presente). En algunas formas de realización, el conector (por ejemplo, un conector clivable) puede ser clivado por una enzima asociada a tumor. En algunas formas de realización, un conector, el cual puede ser clivado por una enzima asociada a tumor, puede estar contenido en un péptido

bloqueante, que puede estar unido no covalentemente a una variante de SIRP- α . Una vez que la proteína de fusión se encuentra en el sitio del cáncer, por ejemplo, dentro de un tumor, el conector es clivado por una enzima asociada a tumor para liberar la variante de SIRP- α del péptido bloqueante, la cual puede entonces unirse a CD47 de superficie celular en células tumorales. Un conector sensible a una enzima asociada a tumor puede contener una porción, por ejemplo, un sustrato proteico, con capacidad de ser clivado específicamente por una enzima, por ejemplo, una proteasa, que está solo presente en el sitio del cáncer, por ejemplo, dentro de un tumor. La porción puede seleccionarse en base al tipo de una enzima, por ejemplo, una proteasa, presente en el sitio del cáncer, por ejemplo, dentro de un tumor. Un conector clivable ejemplificativo que puede ser clivado por una enzima asociada a tumor es LSGRSDNH (SEQ ID NO: 47), el cual puede ser clivado por múltiples proteasas, por ejemplo, matriptasa (MTSP1), activador del plasminógeno tipo urinario (uPA), legumaina, PSA (también denominada KLK3, peptidasa relacionada con calicreína 3), metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2), MMP9, elastasa de neutrófilos humanos (HNE) y proteinasa 3 (Pr3). También se encuentran disponibles otros conectores clivables que son susceptibles al clivaje por enzimas (por ejemplo, proteasas). Además de las proteasas mencionadas precedentemente, otras enzimas (por ejemplo, proteasas) que pueden clivar un conector clivable incluyen, a título enunciativo no taxativo, uroquinasa, activador del plasminógeno tisular, tripsina, plasmina y otras enzimas que tienen actividades proteolíticas. De acuerdo con algunas formas de realización de la presente invención, una variante de SIRP- α o una SIRP- α de tipo salvaje está unida a un péptido bloqueante mediante un conector (por

ejemplo, un conector clivable) susceptible al clivaje por enzimas que tienen actividades proteolíticas, tales como una uroquinasa, un activador del plasminógeno tisular, plasmina, o tripsina.

En algunas formas de realización, las secuencias de conectores clivables pueden derivarse y seleccionarse poniendo juntas varias secuencias basadas en diferentes preferencias de enzimas. Los ejemplos no limitantes de varias proteasas potenciales y sus correspondientes sitios de proteasa se describen en la Tabla 7. En la Tabla 7, “—” se refiere a cualquier aminoácido (es decir, cualquier aminoácido de origen natural), las mayúsculas indican una preferencia fuerte por ese aminoácido, las minúsculas indican una preferencia menor por ese aminoácido y “/” separa las posiciones de aminoácido en casos en los que es posible más de un aminoácido en una posición adyacente al “/”. Otras secuencias clivables incluyen, a título enunciativo no taxativo, una secuencia de un colágeno hepático humano (cadena $\alpha 1(\text{III})$) (por ejemplo, GPLGIAGI (SEQ ID NO: 100)), una secuencia de PZP humana (por ejemplo, YGAGLGVV (SEQ ID NO: 101), AGLGVVER (SEQ ID NO: 102), o AGLGISST (SEQ ID NO: 103)) y otras secuencias que son autolíticas (por ejemplo, VAQFVLTE (SEQ ID NO: 104), AQFVLTEG (SEQ ID NO: 105), o PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 106)).

Tabla 7

Proteasa	Potenciales sitios de proteasa
uPA:	L/S/G-/R--/S-/D/N/H (SEQ ID NO: 69); -/s/gs/Rk-/rv/-/-/ (SEQ ID NO: 70); SGR-SA (SEQ ID NO: 71)
Matriptasa:	L/S/G-/R--/S-/D/N/H (SEQ ID NO: 72); r/-/--/Rk-/v/-/-/g/- (SEQ ID NO: 73); RQAR-VV (SEQ ID NO: 74); r/-/-

Proteasa	Potenciales sitios de proteasa
	/Rk/v/-/g (SEQ ID NO: 75); /Kr/RKQ/gAS/RK/A (SEQ ID NO: 76)
Legumaina:	L/S/G-/R--/S-/D/N/H (SEQ ID NO: 77); ---/--/-/N/-/-/ (SEQ ID NO: 78); AAN-L (SEQ ID NO: 79); ATN-L (SEQ ID NO: 80)
PSA	si/sq/-/yqr s/s/-/- (SEQ ID NO: 81); S/S/K/L/Q (SEQ ID NO: 82)
MMP2	-/p/-/- /li/-/-/- (SEQ ID NO: 83)
MMP9	g/pa/-/gl/-/g/- (SEQ ID NO: 84); G/P/L/G/I/A/G/Q (SEQ ID NO: 85); P/V/G/L/I/G (SEQ ID NO: 86); H/P/V/G/L/L/A/R (SEQ ID NO: 87)
HNE	-/-/-/viat/-/-/- (SEQ ID NO: 88)
Pr3	-/y/y/vta -/-/-/- (SEQ ID NO: 89)
Pro-uroquinasa	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 90); PRFRIIGG (SEQ ID NO: 91)
TGF β	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 92)
Plasminógeno	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 93)
Estafiloquinasa	SSSFDKGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 94); SSSFDKGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 95)
Factor Xa	IEGR; IDGR (SEQ ID NO: 96); GGSIDGR (SEQ ID NO: 97)
Gelatinasa	PLGLWA (SEQ ID NO: 98)
Colagenasa de fibroblastos	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 99)

Proteasa	Potenciales sitios de proteasa
humanos	

En la literatura hay informes de niveles aumentados de enzimas que tienen sustratos conocidos en diferentes tipos de cánceres, por ejemplo, tumores sólidos. Véase, por ejemplo, La Rocca y col., *Brit. J. Cancer* 90:1414-1421 y Ducry y col., *Bioconjug. Chem.* 21:5-13, 2010, cada uno de los cuales se incorpora a modo de referencia en su totalidad a la presente. Las enzimas asociadas a tumores también pueden identificarse usando técnicas convencionales conocidas en el arte, por ejemplo, inmunohistoquímica de células tumorales. En una forma de realización ejemplificativa, la porción sensible a enzima en un conector puede ser sustrato de una metaloproteinasa de matriz (MMP), que puede ser clivado por una MMP presente en el sitio del cáncer, por ejemplo, dentro de un tumor. En otra forma de realización ejemplificativa, la porción sensible a enzima en un conector puede ser un conector dipeptídico que contiene maleimido (véase, por ejemplo, Tabla 1 en Ducry y col.), el cual puede ser clivado mediante proteólisis por proteasas (por ejemplo, catepsina o plasmina) presente en niveles elevados en determinados tumores (Koblinski y col., *Chim. Acta* 291:113–135, 2000). En esta forma de realización, el grupo maleimida del conector dipeptídico que contiene maleimido puede conjugarse con un residuo cisteína de la variante de SIRP- α y el grupo ácido carboxílico en el extremo C terminal del conector dipeptídico que contiene maleimido puede conjugarse al grupo amino del extremo N terminal del péptido bloqueante. Similarmente, el grupo maleimida del conector dipeptídico que contiene maleimido puede conjugarse a un residuo cisteína del

péptido bloqueante y el grupo ácido carboxílico en el extremo C terminal del conector dipeptídico que contiene maleimido puede conjugarse al grupo amino del extremo N terminal de la variante de SIRP- α . La espectrometría de masas y otras técnicas disponibles en el campo de la proteómica puede usarse para confirmar el clivaje de la enzima asociada a conectores clivables dependientes de tumor. Otras porciones sensibles a enzimas se describen en la Patente de los EE.UU. No. 8.399.219, que se incorpora a la presente en su totalidad a modo de referencia. En algunas formas de realización, la porción sensible a una enzima asociada a tumor, por ejemplo, un sustrato proteico, puede insertarse entre una variante de SIRP- α y un péptido bloqueante usando técnicas de conjugación de biología celular de moléculas y química convencionales bien conocidas en el arte.

VIII. Albúmina sérica

La fusión a albúmina sérica puede mejorar la farmacocinética de fármacos proteicos y en particular, puede unirse una variante de SIRP- α descrita en la presente a una albúmina sérica. La albúmina sérica es una proteína globular que es la proteína sanguínea más abundante en los mamíferos. La albúmina sérica se produce en el hígado y constituye aproximadamente la mitad de las proteínas séricas de la sangre. Es monomérica y soluble en la sangre. Algunas de las funciones más cruciales de la albúmina sérica incluyen el transporte de hormonas, ácidos grasos y otras proteínas en el cuerpo, amortiguación del pH y mantenimiento de la presión osmótica requerida para la distribución adecuada de los fluidos corporales entre los vasos sanguíneos y los tejidos corporales. En algunas formas de

realización, puede fusionarse una variante de SIRP- α a una albúmina sérica. En formas de realización preferidas, la albúmina sérica es albúmina sérica humana (HSA). En algunas formas de realización de la presente invención, el extremo N terminal de una HSA se une al extremo C terminal de la variante de SIRP- α para aumentar la vida media sérica de la variante de SIRP- α . Puede unirse una HSA, directamente o mediante un conector, al extremo C terminal de la variante de SIRP- α . La unión del extremo N terminal de una HSA al extremo C terminal de la variante de SIRP- α mantiene el extremo N terminal de la variante de SIRP- α libre para interaccionar con CD47 y el extremo proximal del extremo C terminal de la HSA para interaccionar con FcRn. Una HSA que puede usarse en los métodos y composiciones descritos en la presente se conoce de manera general en el arte. En algunas formas de realización, la HSA incluye los aminoácidos 25-609 (SEQ ID NO: 67) de la secuencia de UniProt ID NO: P02768. En algunas formas de realización, la HSA incluye una o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, C34S y/o K573P), en relación a SEQ ID NO: 67. En algunas formas de realización, la HSA tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 68.

IX. Péptidos de unión a albúmina

La unión a proteínas séricas puede mejorar la farmacocinética de fármacos proteicos y en particular las variantes de SIRP- α descritas en la presente pueden fusionarse con péptidos o proteínas de unión a proteínas séricas. En algunas formas de realización, una variante de SIRP- α puede fusionarse a un péptido de unión a albúmina que presenta actividad de unión a albúmina sérica para aumentar la vida media de la variante de SIRP- α . Los

péptidos de unión a albúmina que pueden usarse en los métodos y composiciones descritas en la presente se conocen de manera general en el arte. Véase, por ejemplo, Dennis y col., *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043, 2002 y Miyakawa y col., *J. Pharm. Sci.* 102:3110-3118, 2013. En una forma de realización, el péptido de unión a albúmina incluye la secuencia DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 2). Un péptido de unión a albúmina puede fusionarse genéticamente a una variante de SIRP- α o unirse a una variante de SIRP- α a través de medios químicos, por ejemplo, conjugación química. Si se desea, puede insertarse un espaciador entre la variante de SIRP- α y el péptido de unión a albúmina para permitir flexibilidad estructural y espacial adicional de la proteína de fusión. Los espaciadores específicos y sus secuencias de aminoácidos se describen con detalle más adelante en la presente. En algunas formas de realización, puede fusionarse un péptido de unión a albúmina al extremo N o C terminal de una variante de SIRP- α . En un ejemplo, el extremo C terminal del péptido de unión a albúmina puede fusionarse directamente al extremo N terminal de la variante de SIRP- α mediante un enlace peptídico. En otro ejemplo, el extremo N terminal del péptido de unión a albúmina puede fusionarse directamente al extremo C terminal de la variante de SIRP- α mediante un enlace peptídico. En aún otro ejemplo, el ácido carboxílico en el extremo C terminal del péptido de unión a albúmina puede fusionarse a un residuo aminoacídico interno, es decir, el grupo amino de la cadena lateral de un residuo lisina de la variante de SIRP- α usando técnicas convencionales de conjugación química. Sin estar ligado a la teoría, se espera que la fusión de un péptido de unión a albúmina a una variante de SIRP- α pueda llevar a la

retención prolongada de la proteína terapéutica mediante su unión a albúmina sérica.

X. Dominios Fc

En algunas formas de realización, una construcción de la variante de SIRP- α puede incluir una variante de SIRP- α y un monómero de dominio Fc. En algunas formas de realización, una variante de SIRP- α puede fusionarse a un monómero de dominio Fc de una inmunoglobulina o un fragmento de un monómero de dominio Fc. Como se conoce de manera convencional en el arte, un dominio Fc es la estructura proteica que se encuentra en el extremo C terminal de una inmunoglobulina. Un dominio Fc incluye dos monómeros de dominio Fc que se dimerizan por la interacción entre los dominios constantes del anticuerpo C_H3. Un dominio Fc de tipo salvaje forma la estructura mínima que se une a un receptor de Fc, por ejemplo, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIb, Fc γ RIV. En la presente invención, un monómero de dominio Fc o un fragmento de un dominio Fc fusionado a una variante de SIRP- α para aumentar la vida media sérica de la variante de SIRP- α puede incluir un dímero de dos monómeros de dominio Fc o un monómero de dominio Fc, con la condición que el monómero de dominio Fc pueda unirse al receptor de Fc (por ejemplo, un receptor FcRn). Adicionalmente, un dominio Fc o un fragmento del dominio Fc fusionado a una variante de SIRP- α para aumentar la vida media sérica de la variante de SIRP- α no induce ninguna respuesta relacionada con el sistema inmunológico. En algunas formas de realización, un dominio Fc puede ser mutado para que carezca de funciones efectoras, típicas de un dominio Fc “muerto”. Por ejemplo, un dominio Fc puede incluir sustituciones específicas de

aminoácidos que se sabe que minimizan la interacción entre el dominio Fc y un receptor Fcγ. En algunas formas de realización, un monómero de dominio Fc o un fragmento del dominio Fc puede fusionarse al extremo N o C terminal de una variante de SIRP-α a través de medios genéticos o químicos convencionales, por ejemplo, conjugación química. Si se desea, puede insertarse un conector (por ejemplo, un espaciador sácer) entre la variante de SIRP-α y el monómero de dominio Fc.

Heterodimerización de monómeros de dominio Fc

En algunas formas de realización, cada uno de los dos monómeros de dominio Fc en un dominio Fc incluye sustituciones de aminoácidos que promueven la heterodimerización de los dos monómeros. La heterodimerización de monómeros de dominio Fc puede ser promovida por la introducción de sustituciones diferentes, pero compatibles, en los dos monómeros de dominio Fc, tales como los pares de residuos “botón en ojal” y pares de residuos cargados. El uso de pares de residuos “botón en ojal” se describe en Carter y colaboradores (Ridgway y col., *Protein Eng.* 9:617-612, 1996; Atwell y col., *J Mol Biol.* 270:26-35, 1997; Merchant y col., *Nat Biotechnol.* 16:677-681, 1998). La interacción botón en ojal favorece la formación de heterodímero, mientras que la interacción botón-botón y ojal-ocal impide la formación del homodímero debido a colisiones estéricas y la eliminación de interacciones favorables. La técnica “botón en ojal” también se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 8.216.805, Merchant y col., *Nature Biotechnology* 16:677-681, 1998 y Merchant y col., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:E2987–E2996, 2013, cada una de las

cuales se incorpora en su totalidad a modo de referencia a la presente. Un ojal es un hueco que se crea cuando se reemplaza un aminoácido original en una proteína por un aminoácido diferente que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño. Un botón es una saliente que se crea cuando se reemplaza un aminoácido original en una proteína por un aminoácido diferente que tiene un volumen de cadena lateral más grande. Específicamente, el aminoácido que está siendo reemplazado está en el dominio constante del anticuerpo C_H3 de un monómero de dominio Fc y está involucrado en la dimerización de dos monómeros de dominio Fc. En algunas formas de realización, se crea un ojal en un dominio constante de anticuerpo C_H3 para acomodar un botón en otro dominio constante de anticuerpo C_H3, tal que los aminoácidos del botón y del ojal actúen para promover o en favor de la heterodimerización de los monómeros de dominio Fc. En algunas formas de realización, un ojal en uno de los dominios constantes de anticuerpo C_H3 se crea para acomodar mejor un aminoácido original en otro dominio constante de anticuerpo C_H3. En algunas formas de realización, se crea un botón en un dominio constante de anticuerpo C_H3 para formar interacciones adicionales con los aminoácidos originales en otro dominio constante de anticuerpo C_H3.

Un botón puede construirse por reemplazo de los aminoácidos que tienen cadenas laterales más grandes tales como tirosina o triptofano por aminoácidos que tienen cadenas laterales más pequeñas tales como alanina, valina, o treonina, tal como la mutación Y407V en el dominio constante de anticuerpo C_H3. Similarmente, un botón puede construirse por reemplazo de aminoácidos que tienen cadenas laterales más pequeñas por aminoácidos que tienen cadenas laterales más grandes, tal como la mutación T366W en el

dominio constante de anticuerpo C_H3. En una forma de realización preferida, un monómero de dominio Fc incluye la mutación de botón T366W y el otro monómero de dominio Fc incluye las mutaciones de ojal T366S, L358A y Y407V. Una variante D1 de SIRP- α de la invención puede fusionarse a un monómero de dominio Fc que incluye una mutación de botón T366W para limitar la formación de homodímero botón-botón no deseado. Los ejemplos de pares de aminoácidos botón en ojal se incluyen, sin limitación, en la Tabla 8.

Tabla 8

Monómero de dominio Fc 1	Y407 T	Y407 A	F405 A	T394 S	T366 S L358A Y407 V	T394 W Y407 T	T394 S Y407 A	T366 W T394 S
Monómero de dominio Fc 2	T366 Y	T366 W	T394 W	F405 W	T366 W	T366 Y F405 A	T366 W F405 W	F405 W Y407 A

Además de la estrategia de botón en ojal, también puede usarse la estrategia de atracción electrostática para controlar la dimerización de los monómeros de dominio Fc. La atracción electrostática es la utilización de interacciones electrostáticas favorables entre aminoácidos con carga opuesta en péptidos, dominios proteicos y proteínas para controlar la formación de moléculas proteicas de mayor orden. En particular, para controlar la dimerización de los monómeros de dominio Fc usando la atracción

electrostática, uno o más residuos aminoacídicos que constituyen la interfaz C_H3-C_H3 se reemplazan por residuos aminoacídicos cargados positiva o negativamente tal que la interacción se vuelva electrostáticamente favorable o desfavorable dependiendo de los aminoácidos cargados específicos introducidos. En algunas formas de realización, se reemplaza un aminoácido cargado positivamente en la interfaz, tal como lisina, arginina, o histidina, por un aminoácido cargado negativamente tal como ácido aspártico o ácido glutámico. En algunas formas de realización, se reemplaza un aminoácido cargado negativamente por un aminoácido cargado positivamente. Los aminoácidos cargados pueden introducirse en uno de los dominios constantes de anticuerpo C_H3 que interactúan, o en ambos. La introducción de aminoácidos cargados a los dominios constantes de anticuerpo C_H3 de los dos monómeros de dominio Fc puede promover la formación selectiva de heterodímeros de monómeros de dominio Fc controlado por los efectos de atracción electrostática que resulta de la interacción entre los aminoácidos cargados. La técnica de atracción electrostática también se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 20140024111, Gunasekaran y col., *J Biol Chem.* 285:19637-46, 2010 y Martens y col., *Clin Cancer Res.* 12:6144-52, 2006, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad a modo de referencia a la presente. Los Ejemplos de pares de aminoácidos de atracción electrostática se incluyen, sin limitación, en la Tabla 9.

Tabla 9

Monóm ero de	K40 9D	K40 9D	K40 9E	K40 9E	K39 2D	K39 2D	K39 2E	K39 2E	K40 9D	K37 0E
-----------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

dominio Fc 1									K39 2D	K40 9D K43 9E
Monóm ero de dominio Fc 2	D39 9K	D39 9R	D39 9K	D39 9R	D39 9K	D39 9R	D39 9K	D39 9R	D39 9K D35 6K	D35 6K E35 7K D39 9K

XI. Polímero de polietilenglicol (PEG)

En algunas formas de realización, también puede fusionarse una variante de SIRP- α con un polímero, por ejemplo, polietilenglicol (PEG). La unión de un polímero a un fármaco proteico puede “enmascarar” el fármaco proteico del sistema inmunológico del huésped (Milla y col., *Curr Drug Metab.* 13:105-119, 2012). Adicionalmente, determinados polímeros, por ejemplo, polímeros hidrofílicos, también pueden proveer solubilidad en agua a proteínas y fármacos hidrofóbicos (Gregoriadis y col., *Cell Mol. Life Sci.* 57:1964-1969, 2000; Constantinou y col., *Bioconjug. Chem.* 19:643-650, 2008). En el arte se conocen diferentes polímeros, tales como PEG, cadena de ácido polisiálico (Constantinou y col., *Bioconjug. Chem.* 19:643-650, 2008) y cadena PAS (Schlapschy y col., *Protein Eng. Des. Sel.* 26:489-501, 2013), y pueden usarse en la presente invención. En algunas formas de realización, un polímero, por ejemplo, PEG, puede unirse covalentemente a una variante de SIRP- α , en el

extremo N o C terminal o en un lugar interno, usando métodos químicos convencionales, por ejemplo, conjugación química. En algunas formas de realización, un polímero, por ejemplo, PEG, puede unirse covalentemente a una sustitución o adición de cisteína en la variante de SIRP- α . La sustitución de cisteína en la variante de SIRP- α puede ser I7C, A16C, S20C, T20C, A45C, G45C, G79C, S79C, o A84C, en relación a la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 13-23. La adición de un residuo cisteína en la variante de SIRP- α puede introducirse usando técnicas convencionales en el arte, por ejemplo, síntesis de péptidos, modificación genética, y/o clonado molecular. El polímero, por ejemplo, PEG, puede unirse al residuo cisteína usando conjugación de cisteína-maleimida bien conocida para una persona con experiencia en el arte. Los contenidos de las publicaciones referidas se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Además de las formas de realización descritas precedentemente, también hay disponibles otras tecnologías de extensión de la vida media y pueden usarse en la presente invención para aumentar la vida media sérica de las variantes de la SIRP- α . Las tecnologías de extensión de la vida media incluyen, a título enunciativo no taxativo, E-XTEN (Schellenberger y col., *Nat. Biotechnol.* 27:1186-1192, 2009) y Albu tag (Trussel y col., *Bioconjug Chem.* 20:2286-2292, 2009). Los contenidos de las publicaciones referidas se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

XII. Espaciadores

En algunas formas de realización, pueden usarse espaciadores en la construcción de la variante de SIRP- α . Por ejemplos, una construcción de la

variante de SIRP- α puede incluir una variante de SIRP- α unida a un péptido bloqueante mediante un conector (por ejemplo, un conector clivable). En las mencionadas construcciones SIRP- α , puede insertarse un espaciador entre la variante de SIRP- α y el conector (por ejemplo, un conector clivable), y/o entre el conector (por ejemplo, un conector clivable) y el péptido bloqueante. Para optimizar el espacio entre la variante de SIRP- α y el conector, y/o el espacio entre el conector y el péptido bloqueante, puede utilizarse uno cualquiera o más de los espaciadores descritos más adelante.

En algunas formas de realización de una construcción de la variante de SIRP- α que incluye una variante de SIRP- α unida a un péptido bloqueante mediante un conector (por ejemplo, un conector clivable), el espaciador sirve para posicionar el conector clivable fuera del núcleo de la variante de SIRP- α y el péptido bloqueante tal que el conector clivable esté más accesible para la enzima responsable del clivaje. Se debe entender que la unión de dos elementos en una construcción de la variante de SIRP- α , por ejemplo, una variante de SIRP- α y un conector (por ejemplo, un conector clivable) en una construcción de la variante de SIRP- α que incluye (por ejemplo, en este orden) una variante de SIRP- α , un conector y un péptido bloqueante, no necesita ser de un modo particular de unión o mediante una reacción particular. Cualquier reacción que provee una construcción de la variante de SIRP- α de estabilidad adecuada y compatibilidad biológica es aceptable.

Un espaciador se refiere a una unión entre dos elementos en una construcción de la variante de SIRP- α , por ejemplo, una variante de SIRP- α y un conector (por ejemplo, un conector clivable) en una construcción de la variante de SIRP- α que incluye (por ejemplo, en este orden) una variante de

SIRP- α , un conector y un péptido bloqueante, un conector (por ejemplo, un conector clivable) y un péptido bloqueante en una construcción de la variante de SIRP- α que incluye (por ejemplo, en este orden) una variante de SIRP- α , un conector y un péptido bloqueante, una variante de SIRP- α y un péptido o proteína de unión a proteína sérica, por ejemplo, un péptido de unión a albúmina. Un espaciador también puede referirse a una unión que puede insertarse entre una variante de SIRP- α o una SIRP- α de tipo salvaje y un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo específico de tumor, o un péptido de unión a anticuerpo. Un espaciador puede proveer flexibilidad estructural y/o espacial adicional de la construcción de la variante de SIRP- α . Un espaciador puede ser un enlace químico simple, por ejemplo, un enlace amida, una molécula orgánica pequeña (por ejemplo, una cadena hidrocarbonada), una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una secuencia de entre 3 y 200 aminoácidos), o una combinación de una molécula orgánica pequeña (por ejemplo, una cadena hidrocarbonada) y una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una secuencia de entre 3 y 200 aminoácidos). Un espaciador es estable en condiciones fisiológicas (por ejemplo, pH neutro y concentración de oxígeno adecuada) así como en condiciones características de un sitio de enfermedad, por ejemplo, pH ácido e hipoxia. Un espaciador es estable en un sitio de enfermedad, tal como un sitio del cáncer, por ejemplo, dentro de un tumor.

Un espaciador puede incluir entre 3 y 200 aminoácidos. En el arte se conocen espaciadores peptídicos adecuados e incluyen, por ejemplo, conectores peptídicos que contienen residuos aminoacídicos flexibles, tales como glicina y serina. En determinadas formas de realización, un espaciador

puede contener motivos, por ejemplo, motivos múltiples o repetitivos, de GS, GGS, GGGGS, GGSG, o SGGG. En determinadas formas de realización, un espaciador puede contener entre 2 y 12 aminoácidos que incluyen motivos de GS, por ejemplo, GS, GSGS, GSGSGS, GSGSGSGS, GSGSGSGSGS, o GSGSGSGSGSGS. En otras determinadas formas de realización, un espaciador puede contener entre 3 y 12 aminoácidos que incluyen motivos de GGS, por ejemplo, GGS, GGS GGS, GGS GGS GGS y GGS GGS GGS GGS. En aún otras formas de realización, un espaciador puede contener entre 4 y 12 aminoácidos que incluyen motivos de GGSG, por ejemplo, GGSG, GGSGGGSG, o GGSGGGSGGGSG. En otras formas de realización, un espaciador puede contener motivos de $(GGGS)_n$, en donde n es un entero entre 1 y 10. En otras formas de realización, un espaciador también puede contener aminoácidos diferentes de glicina y serina, por ejemplo, GENLYFQSGG, SACYCELS, RSIAT, RPACKIPNDLKQKVMNH, GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, AAANSSIDLISVPVDSR, o GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS. En algunas formas de realización en la presente invención, pueden usarse uno o más espaciadores peptídicos de 12 o 20 aminoácidos en una construcción de la variante de SIRP- α . Los espaciadores peptídicos de 12 y 20 aminoácidos pueden contener las secuencias GGSGGGSGGGS y SGGSGGGSGGGSGGGSGGG, respectivamente. En algunas formas de realización, pueden usarse uno o más espaciadores peptídicos de 18 aminoácidos que contienen la secuencia GGSGGGSGGGSGGGSGGS en una construcción de la variante de SIRP- α .

En algunas formas de realización, un espaciador también puede tener la estructura general $\text{---W-(CH}_2\text{)}_n\text{---Q---}$, en donde W es NH o CH₂, Q es un aminoácido o un péptido y n es un entero entre 0 y 20.

XIII. Fusión de un péptido bloqueante con una variante de SIRP- α

Un péptido bloqueante (por ejemplo, un péptido bloqueante basado en CD47 que tiene una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 36-46 en la Tabla 6) puede fusionarse al extremo N o C terminal de una variante de SIRP- α mediante un conector, por ejemplo, un conector clivable (por ejemplo, LSGRSDNH (SEQ ID NO: 47)) y opcionalmente uno o más espaciadores (por ejemplo, (GGGGS)_n, fusionado genéticamente al extremo N o C terminal del conector, en donde n es un entero entre 1 y 10). Las secuencias de construcciones de variantes de SIRP- α ejemplificativas incluyen un péptido bloqueante basado en CD47 fusionado a una variante de SIRP- α mediante un conector clivable y uno o más espaciadores se muestran en las secuencias de las SEQ ID NOs: 48-63. La longitud de los espaciadores puede cambiarse para obtener la unión más optimizada entre el péptido bloqueante basado en CD47 y la variante de SIRP- α .

XIV. Métodos para producir construcciones de variantes de SIRP- α

Las construcciones de variantes de SIRP- α de la invención pueden producirse a partir de una célula huésped. Una célula huésped se refiere a un vehículo que incluye los componentes celulares necesarios, por ejemplo, organelas, requeridas para expresar los polipéptidos y construcciones descritas en la presente a partir de sus correspondientes ácidos nucleicos. Los ácidos

nucleicos pueden incluirse en vectores de ácido nucleicos que pueden introducirse en la célula huésped por técnicas convencionales conocidas en el arte (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa, infección, etc.). La selección de los vectores de ácidos nucleicos depende en parte de las células huéspedes a usar. Generalmente, las células huéspedes preferidas son de origen procariótico (por ejemplo, bacteriano) o eucariótico (por ejemplo, mamífero).

Construcción de vector de ácido nucleico y células huéspedes

Una secuencia polinucleotídica que codifica para la secuencia de aminoácidos de una construcción de la variante de SIRP- α puede prepararse por una variedad de métodos conocidos en el arte. Estos métodos incluyen, a título enunciativo no taxativo, mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida a sitio) y mutagénesis por PCR. Una molécula polinucleotídica que codifica para una construcción de la variante de SIRP- α de la invención puede obtenerse usando técnicas estándares, por ejemplo, síntesis de genes. Como alternativa, una molécula polinucleotídica que codifica para una SIRP- α de tipo salvaje puede mutarse para que contenga sustituciones de histidina específicas usando técnicas estándares en el arte, por ejemplo, mutagénesis QuikChange™. Los polinucleótidos pueden sintetizarse usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR.

Las secuencias polinucleotídicas que codifican para construcciones de variantes de SIRP- α pueden insertarse en un vector con capacidad de replicarse y expresar los polinucleótidos en células huéspedes procariotas y eucariotas. Muchos de los vectores se encuentran disponibles en el arte y

pueden usarse para los propósitos de la invención. Cada vector puede contener diferentes componentes que pueden ajustarse y optimizarse para compatibilidad con la célula huésped particular. Por ejemplo, los componentes del vector pueden incluir, a título enunciativo no taxativo, un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia señal, una secuencia polinucleotídica que codifica para una construcción de la variante de SIRP- α de la invención y una secuencia de terminación de la transcripción. En algunas formas de realización, un vector puede incluir sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) que permite la expresión de múltiples construcciones de variantes de SIRP- α . Algunos de los ejemplos de vectores bacterianos de expresión incluyen, a título enunciativo no taxativo, la serie de vectores pGEX (por ejemplo, pGEX-2T, pGEX-3X, pGEX-4T, pGEX-5X, pGEX-6P), la serie de vectores pET (por ejemplo, pET-21, pET-21a, pET-21b, pET-23, pET-24), la serie de vectores pACYC (por ejemplo, pACYDuet-1), la serie de vectores pDEST (por ejemplo, pDEST14, pDEST15, pDEST24, pDEST42) y pBR322 y sus derivados (véase, por ejemplo, Patente de los EE.UU. No. 5.648.237). Algunos ejemplos de vectores de expresión mamíferos incluyen, a título enunciativo no taxativo, pCDNA3, pCDNA4, pNICE, pSELECT y pFLAG-CMV. Otros tipos de vectores de ácidos nucleicos incluyen vectores virales para expresar una proteína en una célula (por ejemplo, una célula de un sujeto). Los mencionados vectores virales incluyen, a título enunciativo no taxativo, vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores poxvirales (por ejemplo, vectores de virus vacuna, tales como Vaccinia Ankara modificado (MVA)), vectores virales adenoasociados y vectores alfavirales.

En algunas formas de realización, las células *E. coli* se usan como células huéspedes para la invención. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen, a título enunciativo no taxativo, *E. coli* 294 (ATCC® 31,446), *E. coli* λ 1776 (ATCC® 31,537, *E. coli* BL21 (DE3) (ATCC® BAA-1025) y *E. coli* RV308 (ATCC® 31,608). En otras formas de realización, las células de mamífero se usan como células huéspedes para la invención. Los ejemplos de tipos de células mamíferas incluyen, a título enunciativo no taxativo, células de riñón embrionario humano (HEK), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células PC3, células Vero y células MC3T3. Las diferentes células huéspedes tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación postraduccional de los productos proteicos. Las líneas de células apropiadas o sistemas huéspedes pueden seleccionarse para asegurarse la modificación correcta y procesamiento de la proteína expresada. Los vectores de expresión descritos precedentemente pueden introducirse en células huéspedes apropiadas usando técnicas convencionales en el arte, por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio y microinyección directa. Una vez que se introducen los vectores en las células huéspedes para la producción de proteína, las células huéspedes se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados de manera apropiada para inducir los promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican para las secuencias deseadas.

Producción, recuperación y purificación de la proteína

Las células huéspedes usadas para producir las construcciones de variantes de SIRP- α de la invención pueden hacerse crecer en medios

conocidos en el arte y adecuados para cultivar las células huéspedes seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados para las células huéspedes bacterianas incluyen caldo de cultivo Luria (LB) más suplementos necesarios, tal como un agente de selección, por ejemplo, ampicilina. Los ejemplos de medios adecuados para las células huéspedes de mamífero incluyen medio esencial mínimo (MEM), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), DMEM con suplemento de suero bovino fetal (FBS) y RPMI-1640.

Las células huéspedes se cultivan a temperaturas adecuadas, tal como entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 39 °C, por ejemplo, entre 25 °C y aproximadamente 37 °C. El pH del medio generalmente es entre aproximadamente 6,8 y 7,4, por ejemplo, 7,0, dependiendo principalmente del organismo huésped. Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de proteína se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor.

La recuperación de la proteína típicamente involucra romper la célula huésped, generalmente usando medios tales como shock osmótico, sonicado, o lisis. Una vez que las células se rompen, los restos celulares pueden quitarse por centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía en resina de afinidad. Pueden emplearse métodos estándares de purificación de proteínas conocidos en el arte. Los siguientes procedimientos son ejemplificativos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmutafinidad o intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase reversa, cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, SDS-PAGE y filtración en gel.

Como alternativa, las construcciones de variantes de SIRP- α pueden ser producidas por las células de un sujeto (por ejemplo, un humano), por ejemplo, en el contexto de terapia, por administración de un vector (por ejemplo, un vector retroviral, vector adenoviral, vector de poxvirus (por ejemplo, vector de virus vacuna, tal como Vaccinia Ankara modificado (MVA)), vector viral adenoasociado y vector alfaviral) que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica para la construcción de la variante de SIRP- α . El vector, una vez dentro de una célula del sujeto (por ejemplo, por transformación, transfección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa, infección, etc.) promoverá la expresión de la construcción de la variante de SIRP- α , que luego es secretada fuera de la célula.

XV. Composiciones y preparaciones farmacéuticas

En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener una o más construcciones de variantes de SIRP- α de la invención como proteínas terapéuticas. Además de una cantidad terapéutica de la proteína, las composiciones farmacéuticas pueden contener un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable, que pueden formularse mediante métodos conocidos para aquellos con experiencia en el arte. En otras formas de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener moléculas de ácido nucleico que codifican para una o más construcciones de variantes de SIRP- α de la invención (por ejemplo, en un vector, tal como un vector viral). La molécula de ácido nucleico que codifica para una construcción de la variante de SIRP- α puede clonarse en un vector de

expresión apropiado, que puede administrarse mediante métodos bien conocidos en la terapia genética.

Los transportadores y excipientes aceptables en las composiciones farmacéuticas no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Los transportadores y excipientes aceptables pueden incluir soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato, HEPES y TAE, antioxidantes tales como ácido ascórbico y metionina, conservantes tales como cloruro de hexametonio, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, resorcinol y cloruro de benzalconio, proteínas tales como albúmina sérica humana, gelatina, dextrano e inmunoglobulinas, polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, histidina y lisina e hidratos de carbono tales como glucosa, manosa, sacarosa y sorbitol. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse de manera parenteral en la forma de una formulación inyectable. Las composiciones farmacéuticas para inyectar pueden formularse usando una solución estéril o cualquier líquido farmacéuticamente aceptable como vehículo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, a título enunciativo no taxativo, agua estéril, solución fisiológica y medio de cultivo celular (por ejemplo, medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio Eagles α -modificado (α -MEM), medio F-12).

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse en microcápsulas, tal como microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato). Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden prepararse en otros sistemas de administración de fármacos tales como liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones,

nanopartículas y nanocápsulas. Las mencionadas técnicas se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20^{ta} edición (2000). Las composiciones farmacéuticas a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estéril.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden prepararse como una formulación de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen las construcciones de variantes de SIRP- α de la invención. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles, poliactidas (Patente de los EE.UU No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOTTM y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Algunas de las formulaciones de liberación sostenida permiten la liberación de moléculas durante unos pocos meses, por ejemplo, entre uno y seis meses, mientras que otras formulaciones liberan composiciones farmacéuticas de la invención durante periodos de tiempo más cortos, por ejemplo, días a semanas.

La composición farmacéutica puede prepararse en una dosis individual según se requiera. La cantidad de un componente activo, por ejemplo, una construcción de la variante de SIRP- α de la invención, incluido en las preparaciones farmacéuticas es tal que se provee una dosis adecuada en el rango designado (por ejemplo, una dosis en el rango entre 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal).

La composición farmacéutica para terapia genética puede estar en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la cual está embebido el vehículo de administración genética. Los vectores que pueden usarse como vehículo para administración genética *in vivo* incluyen, a título enunciativo no taxativo, vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores poxvirales (por ejemplo, vectores de virus vacuna, tal como Vaccinia Ankara modificado (MVA)), vectores virales adenoasociados y vectores alfavirales. En algunas formas de realización, un vector puede incluir sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) que permite la expresión de múltiples construcciones de variantes de SIRP- α . Otros vehículos y métodos para la administración genética se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.972.707, 5.697.901 y 6.261.554, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad a modo de referencia a la presente.

Otros métodos para producir composiciones farmacéuticas se describen en, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.478.925, 8.603.778, 7.662.367 y 7.892.558, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad a modo de referencia a la presente.

XVI. Rutas, dosificaciones y tiempos de administración

Las composiciones farmacéuticas de la invención que contienen una o más construcciones de variantes de SIRP- α como las proteínas terapéuticas pueden formularse para la administración parenteral, administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraarterial, administración intratecal, o administración intraperitoneal. La composición farmacéutica también puede formularse para, o

administrarse vía, administración nasal, en aspersion, oral, en aerosol, rectal, o vaginal. Los métodos para administrar proteínas terapéuticas se conocen en el arte. Véase, por ejemplo, Patente de los EE.UU. Nos. 6.174.529, 6.613.332, 8.518.869, 7.402.155 y 6.591.129 y Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Nos. US20140051634, WO1993000077 y US20110184145, cuyas divulgaciones se incorporan en su totalidad a modo de referencia. Puede usarse uno o más de estos métodos para administrar una composición farmacéutica de la invención que contiene una o más construcciones de variantes de SIRP- α de la invención. Para las formulaciones inyectables, se conocen diferentes transportadores farmacéuticos eficaces en el arte. Véase, por ejemplo, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Pa., Banker and Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982) y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ta ed., páginas 622-630 (1986).

La dosificación de las composiciones farmacéuticas de la invención depende de factores que incluyen la ruta de administración, la enfermedad a tratar y características físicas, por ejemplo, edad, peso, salud general, del sujeto. Típicamente, la cantidad de una construcción de la variante de SIRP- α de la invención contenida en una dosis individual puede ser una cantidad que trata eficazmente la enfermedad sin inducir toxicidad significativa. Una composición farmacéutica de la invención puede incluir una dosificación de una construcción de la variante de SIRP- α que varía en un rango entre 0,001 y 500 mg (por ejemplo, 0,05, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 0,8, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 30 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg, o 500 mg) y, en una forma de realización más específica, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 100 mg y, en una forma de realización más específica, entre

aproximadamente 0,2 y aproximadamente 20 mg. La dosificación puede ser adaptada por el médico de acuerdo con factores convenientes tales como la extensión de la enfermedad y diferentes parámetros del sujeto.

Una composición farmacéutica de la invención puede administrarse en una cantidad entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 500 mg/kg/día (por ejemplo, 0,05, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 0,8, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 30 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg, o 500 mg/kg/día). Las composiciones farmacéuticas de la invención que contienen una construcción de la variante de SIRP- α pueden administrarse a un sujeto que lo requiere, por ejemplo, una o más veces (por ejemplo, entre 1 y 10 veces o más) diariamente, semanalmente, mensualmente, semestralmente, anualmente, o según sea necesario médicamente. Las dosificaciones pueden proveerse en un régimen de dosificación individual o múltiple. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la cantidad eficaz es una dosis que varía en un rango entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 100 mg/kg/día, entre aproximadamente 0,2 mg y aproximadamente 20 mg de la construcción de la variante de SIRP- α por día, entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 10 mg de la construcción de la variante de SIRP- α por día, entre aproximadamente 0,7 mg y aproximadamente 210 mg de la construcción de la variante de SIRP- α por semana, entre 1,4 mg y aproximadamente 140 mg de la construcción de la variante de SIRP- α por semana, entre aproximadamente 0,3 mg y aproximadamente 300 mg de la construcción de la variante de SIRP- α cada tres días, entre aproximadamente 0,4 mg y aproximadamente 40 mg de la construcción de la variante de SIRP- α día por medio y entre aproximadamente 2 mg y aproximadamente 20 mg de la construcción de la variante de SIRP- α

día por medio. El tiempo entre las administraciones puede disminuir según si la condición médica mejora o aumenta a medida que la salud del paciente decae.

XVII. Métodos de tratamiento

La invención provee composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento que pueden usarse para tratar qué pacientes están padeciendo enfermedades y trastornos asociados con actividad de SIRP- α y/o CD47, tales como cánceres y enfermedades inmunológicas. En algunas formas de realización, las construcciones de variantes de SIRP- α descritas en la presente pueden administrarse a un sujeto en un método para aumentar la fagocitosis de una célula blanco (por ejemplo, una célula cancerígena) en el sujeto. En algunas formas de realización, las construcciones de variantes de SIRP- α pueden administrarse a un sujeto en un método para eliminar células T regulatorias en el sujeto. En algunas formas de realización, las construcciones de variantes de SIRP- α pueden administrarse a un sujeto en un método para matar células cancerígenas en el sujeto. En algunas formas de realización, las construcciones de variantes de SIRP- α pueden administrarse a un sujeto en un método para tratar una enfermedad asociada con la actividad de SIRP- α y/o CD47 en el sujeto, en donde la construcción de la variante de SIRP- α preferentemente se une a CD47 en células enfermas o en un sitio de enfermedad respecto a CD47 en células no enfermas. En algunas formas de realización, las variantes de SIRP- α pueden administrarse a un sujeto en un método para aumentar el injerto de células madre hematopoyéticas en el sujeto, en donde el método incluye modular las interacciones entre SIRP- α y

CD47 en el sujeto. En algunas formas de realización, las construcciones de variantes de SIRP- α pueden administrarse a un sujeto en un método para alterar una respuesta inmunológica (es decir, suprimir la respuesta inmunológica) en el sujeto.

En algunas formas de realización, antes de tratar una enfermedad (por ejemplo, cáncer) en un sujeto, se determina la o las secuencias de aminoácidos de SIRP- α en el sujeto, por ejemplo, de cada uno de los dos alelos que codifican para el gen SIRP- α . En este método de la invención, el método determina las secuencias de aminoácidos del polipéptido SIRP- α en una muestra biológica del sujeto y luego administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una construcción de la variante de SIRP- α . En este método, la variante de SIRP- α en la construcción de la variante de SIRP- α tiene la misma secuencia de aminoácidos que la de un polipéptido SIRP- α en la muestra biológica del sujeto, excepto por los cambios de aminoácidos introducidos para aumentar la afinidad de la variante de SIRP- α . La construcción de la variante de SIRP- α tiene inmunogenicidad mínima en el sujeto después que se administra.

Las construcciones de variantes de SIRP- α y composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse en diferentes terapias contra el cáncer. Los cánceres susceptibles al tratamiento de acuerdo con la invención incluyen, a título enunciativo no taxativo, cáncer de tumor sólido, cáncer hematológico, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma no Hodgkin, linfoma Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de pulmón, cáncer de bronquios,

cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y recto, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de vesícula biliar, cáncer de tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de orofaringe, cáncer de esófago, melanoma, cáncer de piel no melanoma, carcinoma de células de Merkel, cáncer inducido viralmente, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal, leucemia, linfoma, sarcoma, glioma, cáncer de cerebro y carcinoma. En algunas formas de realización, las condiciones cancerosas susceptibles de tratamiento para tratar de acuerdo con la invención incluyen cánceres metastásicos. En algunas formas de realización, el cáncer susceptible de tratamiento de acuerdo con la invención es un tumor sólido o cáncer hematológico.

Las construcciones de variantes de SIRP- α y composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse en diferentes terapias para tratar enfermedades inmunológicas. En algunas formas de realización, la enfermedad inmunológica es una enfermedad autoinmunológica o una enfermedad inflamatoria, tal como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, una espondiloartropatía, lupus sistémico eritematoso, una enfermedad inflamatoria mediada por anticuerpos o autoinmunológica, enfermedad de injerto versus huésped, sepsis, diabetes, psoriasis, aterosclerosis, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica progresiva, escleroderma, síndrome coronario agudo, isquemia reperusión, enfermedad de Crohn, endometriosis, glomerulonefritis, miastenia gravis, fibrosis pulmonar idiopática, asma, síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), vasculitis, o miosis autoinmunológica inflamatoria.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Métodos

Producción de construcciones de variantes de SIRP- α

Todas las construcciones genéticas se generan usando síntesis genética y se optimizan los codones para la expresión en células de mamíferos (DNA2.0). Los genes se clonan en vectores de expresión mamíferos y se expresan usando un promotor CMVa-intrón. Se ha diseñado una secuencia líder en el extremo N terminal de las construcciones para asegurar la señalización y procesamiento apropiados para la secreción. La expresión de proteínas de fusión SIRP- α se realiza usando células Expi293F™ (Life Technologies). Esta línea celular está adaptada a cultivo en suspensión libre de suero en alta densidad en medio de expresión Expi293F™ y tiene la capacidad de producir niveles altos de proteínas recombinantes. Los procedimientos de transfección han sido realizados de acuerdo con el manual del fabricante. El sobrenadante típicamente se recolecta entre el día 5 y 7 posterior a la transfección. Las construcciones de proteínas se diseñan para portar una marca de afinidad de 6 histidinas y esto permite la purificación mediante cromatografía de afinidad. La columna primero se equilibró con imidazol 5 mM, Tris HCl 100 mM (pH 8), NaCl 500 mM. El medio clarificado que expresa las diferentes construcciones de variantes de SIRP- α se carga en una resina de afinidad de Hi-Trap Ni Sepharose Excel en Avant 25 (GE Healthcare). Se realiza otro paso de equilibración. Después del mismo, la columna se lava con imidazol 40 mM, Tris 100 mM, 500mM y posteriormente se eluye con imidazol 250 mM, Tris 100 mM, NaCl 500 mM. Las fracciones eluidas que contienen las

construcciones de variantes de SIRP- α se agrupan y luego se realiza el intercambio de solución amortiguadora en 1X PBS.

Clivaje in vitro de proteínas SIRP- α

Se adquirió uPA y matriptasa humanas recombinantes de R&D systems. Se agregó 3 μ M de proteínas SIRP- α a cantidades respectivas de uPA y matriptasa (entre 0,1 y 44 ng) en Tris HCl 50 mM (pH 8,5), Tween 0,01% como se describió. Las reacciones de digestión se incubaron típicamente durante 18 a 24 horas a 37 °C. Para detener la reacción, se agregó indicador de carga para SDS-PAGE a la reacción y se calentó a 95 °C durante 3 minutos. Para evaluar el clivaje, las muestras digeridas se separaron en una SDS-PAGE Tris-Glicina entre 4 y 20%.

Ejemplo 2 – Diseño de construcciones de variantes de SIRP- α que se activarán específicamente en tejido tumoral

El objetivo es diseñar construcciones de variantes de SIRP- α que permanecerán inertes hasta que se activen localmente para unirse a CD47 en tejido tumoral. Esto limitará la unión de SIRP- α a CD47 en la superficie celular de células no enfermas y prevendrá la toxicidad “en blanco” “fuera de tejido” no deseada. Para generar dichas construcciones de variantes de SIRP- α , los péptidos bloqueantes (por ejemplo, un péptido bloqueante basado en CD47) se fusionan genéticamente a la variante de SIRP- α mediante un conector clivable. Los péptidos bloqueantes explorados están basados en sitios de interacción de CD47 con SIRP- α y las secuencias se describen más adelante (secciones (a)-(c)). Los espaciadores que contienen unidades repetidas de GGGGS se

diseñan para flanquear el conector clivable, que con frecuencia codifica para un sitio de reconocimiento de proteasa. En algunas formas de realización, el sitio de clivaje de la proteasa seleccionado es LSGRSDNH, pero son posibles muchos otros. Se selecciona el sitio de clivaje de proteasa LSGRSDNH por su sensibilidad a numerosas proteasas que están sobreexpresadas en una variedad de carcinomas humanos, por ejemplo, matriptasa (MTSP1), activador de plasminógeno tipo urinario (uPA), legumaina, PSA (también denominado KLK3, peptidasa relacionada con calicreína 3), metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2), MMP9, elastasa de neutrófilos humanos (HNE) y proteinasa 3 (Pr3) (Ulisse y col., *Curr. Cancer Drug Targets* 9:32-71, 2009; Uhland y col., *Cell. Mol. Life Sci.* 63:2968-2978, 2006; LeBeau y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:93-98, 2013; Liu y col., *Cancer Res.* 63:2957-2964, 2003).

(a) Bloqueo de SIRP- α por péptidos bloqueantes basados en CD47

Los péptidos bloqueantes basados en CD47 se describen precedentemente. Estos péptidos se unen a SIRP- α con diferentes afinidades y bloquean su función. El extremo N terminal de CD47 es importante para la interacción con SIRP- α , por lo tanto, el análisis estructural predijo la fusión de SIRP- α al extremo C terminal de CD47. Para entender mejor los resultados, se exploran ambas fusiones en extremo N terminal y en extremo C terminal con diferentes longitudes de espaciadores. Se fusionan diferentes péptidos bloqueantes basados en CD47 (por ejemplo, los péptidos listados en la Tabla 6) al extremo N o C terminal de una variante de SIRP- α con un conector clivable y uno o más espaciadores. Las secuencias ejemplificativas de proteínas de fusión que contienen un péptido bloqueante basado en CD47

fusionado a una variante de SIRP- α mediante un conector clivable y uno o más espaciadores se muestran en las secuencias de SEQ ID NOs: 48-56, en donde la porción con subrayado simple indica el péptido bloqueante basado en CD47, la porción con subrayado doble indica el conector clivable y la porción en negrita indica la variante de SIRP- α . Las secuencias de las SEQ ID NOs: 48-51 contienen péptidos bloqueantes basados en CD47 que incluyen 12 o 21 aminoácidos y espaciadores de 2 a 3 repeticiones de GGGGS. Las secuencias de SEQ ID NOs: 52-56 contienen péptidos bloqueantes basados en CD47 que incluyen el dominio IGSF de CD47 (truncado en VVS) que tiene una sustitución C15S y espaciadores de entre 2 y 5 repeticiones de GGGGS o entre 3 y 6 repeticiones de GGS. Adicionalmente, en algunas formas de realización, puede fusionarse una HSA al extremo C terminal de cualquiera de las secuencias de SEQ ID NOs: 48-56. Adicionalmente, en algunas formas de realización, puede fusionarse un monómero de dominio Fc o una HSA (SEQ ID NO: 68) al extremo N o C terminal de cualquiera de las proteínas de fusión listadas en la Tabla 10.

Tabla 10

SEQ ID NO	Proteína de fusión de un péptido bloqueante basado en CD47 y una variante de SIRP- α
48	<u>SEVTELTREGET</u> GGGGSGGGGS <u>LSGRSDNH</u> GGGGSGGGGS EEELQIIQPDKSV LVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDT TKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS

SEQ ID NO	Proteína de fusión de un péptido bloqueante basado en CD47 y una variante de SIRP- α
49	<u>SEVTELTREGETGGGGSGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSE</u> EELQIIQ PKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRVT TVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSV RAKPS
50	<u>GQYTSEVTELTREGETIIELKGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSE</u> EEL QIIQPKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPF PRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEFKSGAGT ELSVRAKPS
51	<u>GQYTSEVTELTREGETIIELKGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGG</u> SEELQIIQPKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEFK SGAGTELSVRAKPS
52	<u>QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFDGA</u> <u>LNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDAKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE</u> <u>TIIELKYRVVSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSE</u> EELQIIQ PKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRVTT VSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSV RAKPS

SEQ ID NO	Proteína de fusión de un péptido bloqueante basado en CD47 y una variante de SIRP- α
53	<u>QLLFNKTKSVEFTFS</u><u>NDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGA</u> <u>LNKSTVPTDFSSAKIEVSQ</u><u>LLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE</u> <u>TIIELKYRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSL</u><u>SGRSDNH</u><u>GGGGSGGGGS</u>EEEL QIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGP PRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCFRKGSPDDVEFKSGAGT ELSVRAKPS
54	<u>QLLFNKTKSVEFTFS</u><u>NDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGA</u> <u>LNKSTVPTDFSSAKIEVSQ</u><u>LLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE</u> <u>TIIELKYRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSL</u><u>SGRSDNH</u><u>GGGGSGGGG</u> SEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCFRKGSPDDVEFK SGAGTELSVRAKPS
55	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQR QGPFPPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCFRKGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS<u>GGSGGSGGSL</u><u>SGRSDNH</u><u>HGGSGGSGGSGGS</u><u>QLLFNKTKSVE</u> <u>FTFS</u><u>NDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGA</u><u>LNKSTVPTDFS</u> <u>SAKIEVSQ</u><u>LLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE</u><u>TIIELKYRVVS</u>

SEQ ID NO	Proteína de fusión de un péptido bloqueante basado en CD47 y una variante de SIRP- α
56	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQR QGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPPDVEFKS GAGTELSVRAKPSGGSGGSGGSGGSLSGRSDNHGGSGGSGGSGGSGGSGGSQL <u>LFNKTKSVEFTFS</u>NDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALN <u>KSTVPTDFSSAKIEVSQ</u>LLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI <u>IELKYRVVS</u>

(b) Bloqueo de la variante de SIRP- α por un CD47 mutante de baja afinidad que tiene un extremo N terminal extendido

Debido a la alta afinidad de la variante de SIRP- α por CD47, existe una posibilidad que después del clivaje del conector, la proteína de fusión pueda no disociarse y la variante de SIRP- α pueda permanecer bloqueada. Para resolver esto, los inventores estudiaron la estructura del complejo SIRP- α -CD47 y diseñaron mutantes de CD47 con afinidad de unión reducida por la variante de SIRP- α en relación a la afinidad de unión por una SIRP- α de tipo salvaje. Por lo tanto, después del clivaje con la proteasa del conector, el mutante CD47 se disociará de la variante de SIRP- α . Los mutantes de CD47 diseñados se describen más adelante. Los experimentos iniciales se realizarán fusionando la variante de SIRP- α al CD47 de tipo salvaje. Estas construcciones de variantes de SIRP- α que incluyen una variante de SIRP- α y un CD47 de tipo salvaje o CD47 mutante se clivarán *in vitro*, se analizarán por SDS-PAGE para asegurar el clivaje y se medirá por biacore para ver su capacidad de unión a CD47 (es

decir, la unión de la variante de SIRP- α a CD47 de tipo salvaje después que se disocia el CD47 mutante de la variante de SIRP- α). Si las construcciones iniciales de variantes de SIRP- α conteniendo una variante de SIRP- α fusionada al CD47 de tipo salvaje se expresan, con capacidad de bloquear la unión a CD47 antes del clivaje con proteasa y con capacidad de unirse a CD47 después del clivaje con la proteasa, los mutantes de CD47 pueden no requerirse. Si estas construcciones iniciales de variantes de SIRP- α son inactivas (es decir, pueden clivarse pero no se unen a CD47 después del clivaje con la proteasa debido a la falta de disociación), entonces se ensayarán otras proteínas de fusión conteniendo una variante de SIRP- α fusionada a los mutantes de CD47 de baja afinidad.

En la estructura cocrystalizada de CD47:SIRP- α (PDB: 4KJY, 4CMM), el extremo N terminal de CD47 existe como piro-glutamato y forma interacciones de enlace de hidrógeno con la Thr66 de una variante de SIRP- α y la Leu66 de una SIRP- α de tipo salvaje (Figura 1). Se plantea la hipótesis que extendiendo el extremo N terminal de CD47 por agregado de un aminoácido, por ejemplo, una glicina, se prevendrá la ciclización de glutamina a piroglutamato y también se creará otros contactos no deseados e interacciones que probablemente alteren las interacciones de enlace de hidrógeno con la Thr66 o la Leu66 y por lo tanto se perturbará la unión de CD47 a SIRP- α . Las secuencias de las proteínas de fusión que contienen un mutante de dominio IgSF de CD47 de baja afinidad y una variante de SIRP- α se muestran en las SEQ ID NOs: 57-59 en la Tabla 11, en donde la porción con subrayado simple indica el mutante del dominio IgSF de CD47 de baja afinidad que contiene los aminoácidos 1 a 118 y C15S, en relación a la SEQ ID NO: 46 de la Tabla 6, la porción con subrayado

doble indica el conector clivable y la porción en negrita indica la variante de SIRP- α . Las SEQ ID NOs: x10-x12 también incluyen espaciadores de entre 3 y 5 repeticiones de GGGGS. Las secuencias similares a SEQ ID NOs: x10-x12 pueden diseñarse y expresarse en las cuales se fusiona un mutante del dominio IgSF de CD47 de baja afinidad al extremo C terminal de una variante de SIRP- α mediante un conector clivable y uno o más espaciadores.

Tabla 11

SEQ ID NO	Proteína de fusión de un mutante de dominio IgSF de CD47 de baja afinidad que tiene un extremo N terminal extendido y una variante de SIRP- α
57	<u>GQLLFNKT</u>KSVEFTFSNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFD <u>GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTR</u> <u>EGETIIELKYRVVSGGGSGGGSGGGSGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEELQ</u> IIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGP PRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEFKSGAG TELSVRAKPS
58	<u>GQLLFNKT</u>KSVEFTFSNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFD <u>GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTR</u> <u>EGETIIELKYRVVSGGGSGGGSGGGSGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGS</u> EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEF KSGAGTELSVRAKPS

SEQ ID NO	Proteína de fusión de un mutante de dominio IgSF de CD47 de baja afinidad que tiene un extremo N terminal extendido y una variante de SIRP- α
59	<u>GQLLFNKT</u>KSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFD <u>GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQ</u>LLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTR <u>EGETIIELKYRVVSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSL</u>SGRSDNHGGGGS GGGGSEEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRV LIYNQRQGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSP DDVEFKSGAGTELSVRAKPS

(c) Bloqueo de SIRP- α por un mutante del dominio IgSF de CD47 de baja afinidad que tiene sustituciones de aminoácidos

El CD47 se une a un bolsillo profundo a SIRP- α (código PDB: 4KJY y 4CMM). Se ha realizado modelaje por computadoras para identificar los residuos aminoacídicos en la región bolsillo de CD47, que, cuando se mutan reducirían la afinidad de unión de CD47 a la variante de SIRP- α , pero mantendrían la afinidad de unión de CD47 a una SIRP- α de tipo salvaje. Los residuos de CD47 identificados son L101Q, L101H, L101Y, T102Q y T102H. Se plantea la hipótesis que un mutante del dominio IgSF de CD47 de baja afinidad que contiene una de estas sustituciones podrá bloquear la variante de SIRP- α eficazmente en el modo unido. Sin embargo, cuando alcanza el sitio del tumor y se produce el clivaje por las proteasas en el conector localmente, el mutante del dominio de IgSF de CD47 de baja afinidad se disociará de la variante de SIRP- α para unirse a una SIRP- α de tipo salvaje, dejando la variante de SIRP- α libre para unirse a CD47 en la superficie celular de células tumorales. El

mutante del dominio IgSF de CD47 de baja afinidad disociado ahora puede bloquear la actividad de la SIRP- α de tipo salvaje. Esto dará potencialmente el resultado de una actividad de bloqueo doble potenciada del mutante del dominio IgSF de CD47 de baja afinidad liberado y la variante de SIRP- α . Para ilustrar cómo se seleccionan los residuos aminoacídicos y el principio de cómo esto puede resultar en el bloqueo diferencial de SIRP- α de tipo salvaje y de la variante de SIRP- α , se muestra un ejemplo usando Ala27 de una SIRP- α de tipo salvaje (Figura 2). Por ejemplo, la Ala27 de la SIRP- α de tipo salvaje es un residuo más pequeño que la Ile27 en la variante de SIRP- α . Por lo tanto, la mutación de Thr102 en el CD47 de tipo salvaje por un aminoácido más grande tal como Gln102, Gln102 en el mutante del dominio IgSF de CD47 de baja afinidad puede producir una colisión estérica con la Ile27 en la variante de SIRP- α en el sitio de interacción correspondiente. Sin embargo, la interacción entre el CD47 mutante que tiene la sustitución Thr102Gln y la SIRP- α de tipo salvaje que tiene Ala27 podría preservarse. En consecuencia, el mutante de CD47 podría tener una baja afinidad de unión por la variante de SIRP- α y una afinidad de unión relativamente alta por la SIRP- α de tipo salvaje. Las secuencias de algunos mutantes del dominio IgSF de CD47 de baja afinidad ejemplificativos se muestran en SEQ ID NOs: 41-45 en la Tabla 6. Las secuencias de las construcciones de variantes de SIRP- α que contiene el mutante del dominio IgSF de CD47 de baja afinidad que tienen sustituciones de aminoácidos y una variante de SIRP- α se muestran en las SEQ ID NOs: 60-63 en la Tabla 12, en donde la porción con subrayado simple indica el mutante del dominio IgSF de CD47 de baja afinidad que contiene la sustitución de aminoácido L101Q, L101Y, T102Q y T102H, respectivamente, la porción con

subrayado doble indica el conector clivable y la porción en negrita indica la variante de SIRP- α . Las SEQ ID NOs: 60-63 también incluyen espaciadores de entre 3 y 5 repeticiones de GGGGS. Las secuencias similares a las SEQ ID NOs: 60-63 pueden diseñarse y expresarse en las cuales se fusiona un mutante del dominio IgSF de CD47 de baja afinidad al extremo C terminal de una variante de SIRP- α mediante un conector clivable y uno o más espaciadores.

Tabla 12

SEQ ID NO	Proteína de fusión de un mutante del dominio IgSF de CD47 de baja afinidad que tiene sustituciones de aminoácidos y una variante de SIRP- α
60	<u>QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPC</u><u>FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGA</u> <u>LNKSTVPTDFSSAKIEVSQ</u><u>LLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEQ</u><u>TREGE</u> <u>TIIELKYRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS</u><u>LSGRSDNH</u><u>GGGGSGGGGSEEEEL</u> QIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPF PRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGT ELSVRAKPS
61	<u>QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPC</u><u>FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGA</u> <u>LNKSTVPTDFSSAKIEVSQ</u><u>LLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEY</u><u>TREGE</u> <u>TIIELKYRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS</u><u>LSGRSDNH</u><u>GGGGSGGGGSEEEEL</u> QIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPF PRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGT ELSVRAKPS

62	<u>QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGA</u> <u>LNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELQREGE</u> <u>TIIELKYRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEEEEL</u> QIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPF PRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGT ELSVRAKPS
63	<u>QLLFNKTKSVEFTFSNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGA</u> <u>LNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEHLHREGE</u> <u>TIIELKYRVVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLSGRSDNHGGGGSGGGGSEEEEL</u> QIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPF PRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGT ELSVRAKPS

Ejemplo 3 – Expresión y producción de construcciones de variantes de SIRP- α para estudios *in vitro*

Se expresaron diferentes construcciones de variantes de SIRP- α (SEQ ID NOs: 48-56) que incluyen una variante de SIRP- α y un péptido bloqueante basado en CD47 en células de mamífero Expi293-F. Todas las construcciones se diseñaron con una secuencia líder que permite la expresión como proteínas secretadas hacia el medio. Todas las construcciones se expresaron en la forma soluble y se purificaron usando el aislamiento IMAC en un paso hasta un grado alto de pureza (Figuras 3A y 3B). En la Figura 3A se muestra un gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras de construcciones de variantes de SIRP- α de la SEQ ID NOs: 48-56 y en la Figura 3B se muestra un gel SDS-PAGE en condiciones no reductoras de las construcciones de variantes de SIRP- α . Los

datos de exclusión molecular indicaron que las construcciones de variantes de SIRP- α no están agregadas (datos no presentados).

Ejemplo 4 – Clivaje *in vitro* de proteínas de fusión de SIRP- α y CD47

Para determinar si las construcciones de variantes de SIRP- α (por ejemplo, SEQ ID NOs: 48-63) se clivarían específicamente *in vivo* en los sitios tumorales, se llevaron a cabo experimentos *in vitro* usando proteasas uPA y matriptasa, que se sabe que comúnmente pueden tener expresión aumentada en cáncer, para clivar las construcciones de variantes de SIRP- α . Los experimentos iniciales se llevaron a cabo usando la construcción de la variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 54) para determinar la capacidad de clivaje por proteasa y optimizar las condiciones de clivaje. La Figura 4A muestra los resultados de la prueba de capacidad de clivaje por uPA y matriptasa. Se incubaron 3 μ M de la construcción de la variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 54) durante 18 hrs a 37 °C usando un exceso de uPA o de matriptasa. La calle 1 de la Figura 4A muestra el experimento control sin agregado de proteasa y las calles 2 y 3 muestran la incubación de la construcción de la variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 54) con uPA y matriptasa, respectivamente. Los datos obtenidos como se muestra en la Figura 4A demuestran claramente que la construcción de la variante de SIRP- α (SEQ ID No: 54) se puede clivar y liberar *in vitro* mediante la digestión de la construcción de la variante de SIRP- α con exceso de uPA y matriptasa durante 18 hrs a 37 °C. La variante de SIRP- α clivada migra como una banda de un peso molecular ~17 KDa. La CD47 clivada migra con un bandeo chorreado, probablemente debido a la glicosilación, alrededor de 36-40 kDa. Mediante la comparación de la cantidad de construcción de la variante de SIRP- α sin cortar en las calles 2 y 3 de la Figura 4A, parece que se

consiguió un clivaje más completo usando matriptasa en comparación con el uso de uPA.

Por lo tanto, se llevó a cabo una optimización adicional de las condiciones de clivaje usando solo matriptasa, y los resultados se muestran en la Figura 4B. Se ensayaron diferentes cantidades de matriptasa y el clivaje se llevó a cabo durante 18 hrs a 37 °C. La calle 1 de la Figura 4B muestra el experimento control sin agregado de matriptasa y las calles 2 a 4 muestran cada una el clivaje llevado a cabo con 44 ng, 0,44 ng y 0,167 ng de matriptasa, respectivamente. Los datos que se obtuvieron indican que 0,44 ng de enzima es suficiente para clivar completamente bajo las condiciones actuales. Luego, los inventores ensayaron el clivaje del resto de las construcciones de variantes de SIRP- α usando las condiciones optimizadas de clivaje. Como ejemplo y mostrado en la Figura 4C, las respectivas construcciones de variantes de SIRP- α (SEQ ID NOs: 57-63) se clivaron exitosamente *in vitro* con matriptasa usando las condiciones optimizadas de clivaje. Las calles 1 a 7 de la Figura 4C corresponden a las proteínas de fusión no clivadas de SEQ ID NOs: 57-63, respectivamente. Las calles 8 a 14 de la Figura 4C corresponden a las proteínas de fusión de SEQ ID NOs: 57-63, respectivamente, clivadas con matriptasa.

Ejemplo 5 – Afinidades de unión de construcciones de variantes de SIRP- α

La unión de CD47 humano-hFc (R & D Systems, número de catálogo 4670-CD) a las construcciones de variantes de SIRP- α se analizó en un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare) usando solución salina amortiguada

con fosfato (pH 7,4) suplementada con 0,01% de Tween-20 como solución amortiguadora de corrida.

La Unidad de Resonancia 370 (RU) de CD47-hFc se inmovilizó en la celda de flujo 2 de un chip sensor CM4 (GE Healthcare) mediante acoplamiento estándar con aminas. La celda de flujo 1 se activó con EDC/NHS y se bloqueó (con etanolamina) para servir como referencia. Todas las construcciones de variantes de SIRP- α se inyectaron a 50 nM o 100 nM durante dos minutos a una velocidad de flujo de 30 μ L/min continuados por 10 minutos de tiempo de disociación. Después de cada inyección, se regeneró la superficie usando una mezcla 2:1 de solución amortiguadora de elusión Pierce IgG (Life Technologies, número de catálogo 21004) y NaCl 4 M. La regeneración completa de la superficie se confirmó por inyección de las variantes de SIRP- α al comienzo y al final del experimento. Todos los sensogramas tuvieron doble referencia usando la celda de flujo 1 y una inyección de solución amortiguadora.

Para todas las muestras, se determinó la señal de unión a 100 nM después de 50 segundos de asociación, se normalizó al peso molecular de la construcción de la variante de SIRP- α y se expresó como porcentaje de respuesta de unión máxima. La unión de la variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 31) a 100 nM normalizada por su PM se usó como respuesta de unión máxima. Los resultados de la Figura 5A muestran que las construcciones de variantes de SIRP- α (SEQ ID NOs: 48-51) no bloquean a las variantes de SIRP- α en la unión a CD47 sobre el chip. Después del clivaje del conector, la actividad de unión se incrementa en forma modesta. Las construcciones de variantes de SIRP- α (SEQ ID NOs: 52-54) bloquearon eficazmente la unión de la variante de

SIRP- α a CD47 sobre el chip. Sin embargo, después del clivaje del conector, la actividad de unión de la variante de SIRP- α a CD47 sobre el chip solo se incrementó modestamente, lo que sugiere que la alta afinidad de la interacción entre la variante de SIRP- α y el dominio IgSF de CD47 mantiene junto al complejo y por lo tanto el dominio IgSF de CD47 continua bloqueando a la variante de SIRP- α incluso después de clivar el conector. Sorprendentemente, cuando el dominio IgSF de CD47 se fusiona al extremo C terminal de SIRP- α (SEQ ID NO: 55), la construcción de la variante intacta de SIRP- α se bloquea eficazmente para su unión a CD47 sobre el chip (igual que las proteínas de fusión de SEQ ID NOs: 52-54), pero el clivaje del conector restituye al 100% la unión de la variante de SIRP- α a CD47 sobre el chip, lo que sugiere que el dominio IgSF de CD47 se disoció de la variante de SIRP- α después del clivaje del conector, por lo tanto, la variante de SIRP- α está libre para unirse a CD47 sobre el chip. Luego se usó otra construcción con CD47 fusionada al extremo C terminal de una variante de SIRP- α (véase la Figura 5B). Esta construcción (SEQ ID NO: 56), que contiene un mayor espacio, también recuperó la actividad después del clivaje, lo que confirma la estrategia general de la conexión del extremo N terminal de un péptido bloqueante basado en CD47 al extremo C terminal de una variante de SIRP- α para obtener construcciones de SIRP- α en donde el péptido bloqueante basado en CD47 bloquea eficazmente a la variante de SIRP- α y se disocia después del clivaje del conector clivable.

Para examinar más la afinidad de unión de las construcciones de variantes de SIRP- α , se analizaron las construcciones de variantes de SIRP- α de SEQ ID NOs: 52-63 en el instrumento Biacore siguiendo el mismo protocolo que se describió previamente. Las construcciones de variantes de SIRP- α de

SEQ ID NOs: 52-54 contienen el dominio CD47 IgSF que tiene los aminoácidos 1 a 117 y C15S, en relación a la CD47 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 35) fusionado al extremo N terminal de la variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 31) a través del conector clivable LSGRSDNH y múltiples espaciadores de diferentes longitudes. Las construcciones de variantes de SIRP- α de SEQ ID NOs: 55 y 56 contienen el dominio IgSF de CD47 con los aminoácidos 1-117 y C15S, en relación a CD47 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 35) fusionado al extremo C terminal de la variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 31) a través del conector clivable LSGRSDNH y múltiple espaciadores de diferentes longitudes. Las construcciones de variantes de SIRP- α de SEQ ID NOs: 57-59 contienen el dominio IgSF de CD47 con los aminoácidos 1-118 y C15S, en relación a SEQ ID NO: 46 en la Tabla 6 fusionado al extremo N terminal de la variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 31) a través del conector clivable LSGRSDNH y múltiples espaciadores de diferentes longitudes. Las construcciones de variantes de SIRP- α de SEQ ID NOs: 60-63 contienen el dominio IgSF de CD47 que tiene los aminoácidos 1-117 de SEQ ID NOs: 41, 42, 44 y 45 en la Tabla 6, respectivamente, fusionado al extremo N terminal de la variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 31) a través del conector clivable LSGRSDNH y múltiples espaciadores de diferentes longitudes.

La Figura 5B muestra que las construcciones de variantes de SIRP- α de SEQ ID NOs: 55 y 56 fueron eficazmente bloqueadas en su unión a CD47 sobre el chip antes del clivaje del conector, pero el clivaje del conector restituyó el 100% de la actividad de unión. Se observaron resultados similares para las construcciones de variantes de SIRP- α de la SEQ ID NO: 57-63. Los inventores observaron que mediante la extensión del extremo N terminal del péptido

bloqueante basado en CD47 con un residuo de glicina se generó una construcción de la variante de SIRP- α que se bloqueó eficazmente antes de clivar el conector y subsiguientemente se recuperó a cerca del 100% de la actividad de unión a CD47 después del tratamiento con proteasa (SEQ ID NOs: 57-59), demostrando la disociación del péptido bloqueante basado en CD47 de la variante de SIRP- α después del clivaje del conector.

Este resultado sugiere que la variante de SIRP- α fusionada al extremo N terminal del péptido bloqueante basado en CD47 a través de un conector clivable y espaciadores, funciona bien. El conector clivable estabiliza al complejo de fusión y una vez clivado, el extremo extendido N terminal del péptido bloqueante basado en CD47, que incluye un fragmento del conector clivable unido al extremo N terminal del péptido bloqueante basado en CD47, evita la unión del péptido bloqueante basado en CD47 a la variante de SIRP- α . El mismo efecto se obtiene mediante la fusión de un péptido bloqueante basado en CD47 que tiene una o más adiciones de aminoácido, por ejemplo, una adición de glicina (por ejemplo, secuencias de SEQ ID NO: 46 en la Tabla 6), al extremo N terminal del péptido bloqueante de CD47 al extremo C terminal de una variante de SIRP- α a través de un conector clivable y uno o más espaciadores. Este mismo efecto también se observa mediante la fusión de un péptido bloqueante basado en CD47 que tiene una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, L101Q, L101Y, L101H, T102Q, o T102H (por ejemplo, secuencias de SEQ ID NOs: 41-45 en la Tabla 6), al extremo C terminal de una variante de SIRP- α a través de un conector clivable y uno o más espaciadores. Los inventores han demostrado que los péptidos bloqueantes basados en CD47 se pueden fusionar al extremo C terminal de una variante de

SIRP- α y pueden bloquear la unión de la variante de SIRP- α a CD47 antes del clivaje del conector y liberar la variante de SIRP- α después del clivaje del conector (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 55 en la Figura 5A y SEQ ID NOs: 55 y 56 en la Figura 5B).

En base a esta información, los inventores pueden crear proteínas de fusión de variantes de SIRP- α bloqueadas para CD47, es decir, fusionando un monómero de dominio Fc o HSA a una variante de SIRP- α , mediante la elección de la orientación (por ejemplo, fusión en N o C-terminal) que da mejores resultados en farmacocinética, eficacia, seguridad, producción y estabilidad del producto.

Ejemplo 6 – Direccionamiento específico de variantes de SIRP- α a través de péptido de unión a anticuerpo

Primero, los inventores usaron Cetuximab, que se sabe que contiene un sitio de unión para la DLP que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 64, para chequear si la construcción de la variante de SIRP- α que incluye una variante de SIRP- α y la DLP es capaz de concentrarse sobre anticuerpo unido. Los inventores inmovilizaron Cetuximab usando química de EDC/NHS en un chip Biacore CM4 (2000RU) e hicieron fluir la construcción de la variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 66) a 100 nM y 50 nM usando PBS 0,01% de P20 como soluciones amortiguadoras de corrida y muestra a 30 μ L/min sobre el chip (Biacore T100). Figura: 6 muestra la unión de la construcción de la variante de SIRP- α , pero no de la variante de SIRP- α sola, sobre el chip. Los inventores inyectaron luego CD47-ECD y vieron la unión de CD47 en el caso en donde se usó la construcción de la variante de SIRP- α , demostrando que la construcción de la variante de SIRP- α se puede unir a EGFR y a CD47 simultáneamente

(Figura 6). Por lo tanto, la construcción de la variante de SIRP- α que incluye una variante de SIRP- α u una DLP inyectada a un paciente con cáncer se concentraría en el sitio en donde se acumula el anticuerpo terapéutico (por ejemplo, Cetuximab), incrementando la eficacia y reduciendo la toxicidad.

Segundo, los inventores demostraron que la construcción de la variante de SIRP- α que incluye una variante de SIRP- α a una DLP se puede unir primero a Cetuximab que está unido al EGFR, y luego unirse a CD47. En la Figura 7A se muestra un esquema del complejo de unión. Los inventores inmovilizaron 3000 RU de hrEGFR-Fc (R&D Systems) a un chip CM4 usando química de EDC/NHS. Mediante el uso de PBS 0,01% de P20 como solución amortiguadora de corrida a 30 μ L/min (Biacore T100), los inventores inyectaron diferentes concentraciones (4, 20 y 100 nM) de Cetuximab. Se observó unión de Cetuximab al hrEGFR-Fc inmovilizado. Los inventores inyectaron luego la construcción de la variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 66) a 100 nM y observaron unión. No se observó unión cuando la variante de SIRP- α se inyectó sola. Los inventores inyectaron luego CD47-ECD a 100 nM y observaron unión. Los datos se muestran en las Figuras 7B y 7C. Por lo tanto, los inventores demostraron que la formación del complejo cuaternario EGFR-Cetuximab-variante de construcción de SIRP- α de la SEQ ID NO: 66-CD47 es posible. La construcción de la variante de SIRP- α que incluye una variante de SIRP- α a una DLP es capaz de unirse e inhibir a CD47 cuando la construcción se preconcentra en el sitio de la enfermedad mediante la unión específica a un anticuerpo específico de tumor (por ejemplo, Cetuximab). Más aún, siguiendo el mismo concepto, una construcción de la variante de SIRP- α que incluye una variante de SIRP- α , una DLP y un péptido bloqueante basado en CD47

también es capaz de unirse e inhibir a CD47 cuando la construcción se preconcentra en el sitio de enfermedad mediante la unión específica a un anticuerpo específico de tumor (por ejemplo, Cetuximab).

Ejemplo 7 – Ensayo de fagocitosis

Se probó la construcción de variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 66), que incluye una variante de SIRP- α unida a DLP a través de espaciadores y una variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 31) ensayo de fagocitosis en células DLD1 (Figura 8). El ensayo de fagocitosis se llevó a cabo como se describe en, por ejemplo, Weiskopf y col, *Science* 341:88-91, 2013. Un protocolo experimental se describe más adelante. La construcción de la variante de SIRP- α (SEQ ID NO: 66) mostró mayor potencia que la variante de SIRP- α sola (SEQ ID NO: 31), presumiblemente debido a una mayor acumulación en las células enfermas.

Se obtuvieron células blancas del Stanford Blood Center de donantes anónimos y se enriquecieron las células mononucleares de sangre periférica por centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare). Los monocitos se purificaron usando el Macs Miltenyi Biotec Monocyte Isolation Kit II de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este es un sistema de marcado magnético indirecto para el aislamiento de monocitos a partir de PBMC humanas. Los monocitos aislados se diferencian a macrófagos mediante cultivo en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero AB humano inactivado con calor y 1% de GlutaMax y 1% de penicilina y estreptomicina (GIBCO Life Technologies) entre 6 y 10 días. Para el ensayo de fagocitosis, se plaquean 100.000 células GFP+ DLD-1 en los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo en U de ultra baja unión (Corning 7007) y se

agregan 50 μ L/pocillo de 4 μ g/ml de control de isotipo IgG1k o bien 4 μ g/ml de Cetuximab (Anticuerpo Absoluto, Ab00279-10.0) a las células tumorales DLD-1 y se preincuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de eso, se agregan 50 μ L/pocillo de las viariantes de SIRP- α y también se agregan 50 μ L/pocillo de macrófagos (1×10^6 /ml) (50.000 macrófagos) a cada pocillo. La dilución final de los anticuerpos y de las muestras de construcciones de SIRP- α es 1:4. La concentración final de Cetuximab es 1 μ g/ml. Los cocultivos de macrófagos, células tumorales, anticuerpos y variantes de SIRP- α se llevan a cabo durante 2 horas a 37 °C. Para el análisis, se fijaron muestras de células, se tiñeron y se analizaron por BD FACS Canto. Los macrófagos humanos primarios se identificaron por citometría de flujo usando anticuerpos anti-CD14, anti-CD45, o anti-CD206 (BioLegend). Las células muertas se excluyeron del análisis por tinción con DAPI (Sigma). La fagocitosis se evaluó como el porcentaje de macrófagos GFP+ y se normalizó a la respuesta máxima para cada donante independiente contra cada línea celular.

Ejemplo 8 – Modelado de la unión dependiente de pH de las variantes de SIRP- α a CD47

Para modificar la unión dependiente de pH de una variante de SIRP- α de la invención, se puede llevar a cabo una mutagénesis de histidinas sobre la SIRP- α , especialmente en la región de SIRP- α que interactúa con CD47. Se pueden usar las estructuras cristalinas de un complejo de SIRP- α y CD47 (véase, por ejemplo, PDB ID No. 2JJS) y modelado por computadora para visualizar el sitio de unión tridimensional de SIRP- α y CD47. El diseño computacional y los métodos de modelado útiles en el diseño de una proteína con propiedades de unión sensibles al pH son conocidos en la literatura y se

describen en, por ejemplo, Strauch y col., *Proc Natl Acad Sci* 111:675-80, 2014, que se incorpora como referencia a la presente en su totalidad. En algunas formas de realización, se puede usar modelado por computadora para identificarlos residuos de contacto claves en la interface de SIRP- α y CD47. Los residuos de contacto claves identificados se pueden sustituir por residuos de histidina usando un programa de diseño proteico disponible (por ejemplo, RosettaDesign), que puede generar diversos diseños proteicos que se pueden optimizar, filtrar y ordenar en base a la energía de unión calculada y a la complementaridad de formas. Por lo tanto, pueden identificarse las sustituciones de histidina energéticamente favorables en ciertas posiciones de aminoácido usando métodos de diseño computacional. El modelado por computadora también se puede usar para predecir el cambio de la estructura tridimensional de SIRP- α . Las sustituciones de histidina que generan un cambio significativo en la estructura tridimensional de SIRP- α pueden evitarse.

Una vez que se identifican las sustituciones de aminoácidos energéticamente y estructuralmente óptimas, los aminoácidos se pueden sustituir sistemáticamente con los residuos de histidina. En algunas formas de realización, se pueden sustituir uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc, con un máximo de 20) aminoácidos de SIRP- α por residuos de histidina. En particular, los aminoácidos que se localizan en la interface de SIRP- α y CD47, preferentemente, los aminoácidos directamente implicados en la unión de SIRP- α a CD47, pueden sustituirse por residuos de histidina. Las variantes de SIRP- α de la invención pueden incluir una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc, con un máximo de 20) sustituciones de residuos de histidina. En otras

formas de realización, se pueden sustituir residuos de histidina de origen natural de SIRP- α por otros residuos de aminoácido. En aún otras formas de realización, se pueden sustituir uno o más aminoácidos de SIRP- α por residuos distintos a histidina con el objetivo de afectar la unión de los residuos de histidina de origen natural o sustituidos, a CD47. Por ejemplo, la sustitución de los aminoácidos que rodean a un residuo de histidina de origen natural por otros aminoácidos puede “enterrar” el residuo de histidina de origen natural. En algunas formas de realización, también se pueden sustituir aminoácidos no directamente implicados en la unión con CD47, es decir, aminoácidos internos (por ejemplo, aminoácidos localizados en el núcleo de SIRP- α) por residuos de histidina. La Tabla 4 lista los aminoácidos específicos de SIRP- α que se pueden sustituir con residuos de histidina. Los residuos de contacto son los aminoácidos que se localizan en la interface de SIRP- α y CD47. Los residuos de núcleo son los aminoácidos internos no directamente implicados en la unión entre SIRP- α y CD47. Las variantes de SIRP- α de la invención pueden incluir una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc., o todas) de las sustituciones que se listan en la Tabla 4.

Ejemplo 9 – Generación y cribado de variantes de SIRP- α con unión dependiente del pH a CD47

Se pueden generar variantes de SIRP- α que contienen una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc., con un máximo de 20) sustituciones de aminoácidos por residuos de histidina usando técnicas de clonado molecular y de expresión proteica convencionales. Se puede clonar una molécula de ácido nucleico que codifica para una variante de SIRP- α de la invención en un vector optimizado para su expresión en

bacterias usando técnicas de biología molecular bien conocidas. El vector se puede transformar entonces en células de bacterias (por ejemplo, células de *E. coli*), que se pueden crecer hasta densidad óptima antes de la inducción de la expresión proteica. Después de la inducción de la expresión proteica (es decir, usando IPTG), se pueden dejar creciendo las células bacterianas durante otras 24 horas. Se pueden recolectar las células y se puede purificar la proteína variante de SIRP- α expresada a partir del sobrenadante de cultivo celular usando, por ejemplo, cromatografía de afinidad en columna. La variante de SIRP- α purificada se puede analizar por SDS-PAGE seguido por tinción con azul de Coomassie para confirmar la presencia de las bandas proteicas de tamaño esperado.

Las variantes de SIRP- α purificadas se pueden cribar para estudiar su unión dependiente del pH a CD47 usando técnicas disponibles en el arte, tales como exposición en fagos, exposición en levaduras, resonancia de plasmón superficial, ensayos de proximidad por centelleo, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN), extinción de fluorescencia, y/o transferencia de fluorescencia. También se puede cribar la unión usando un bioensayo adecuado. La variante de SIRP- α deseada se une a CD47 con una afinidad mayor a pH ácido (por ejemplo, pH menor que 7 (por ejemplo, pH 6)) que a pH neutro (por ejemplo, pH 7,4). La KD de un complejo SIRP- α /CD47 a pH 6 sería menor que la KD de un complejo SIRP- α /CD47 a pH 7,4.

Ejemplo 10 – Ensayo de variantes de SIRP- α con unión dependiente del pH a CD47 en ratones

Se pueden usar modelos de diversos cánceres de ratones genéticamente modificados, por ejemplo, de tumores sólidos y cánceres

hematológicos, para ensayar la unión dependiente del pH de las variantes de SIRP- α de la invención a CD47 en un sitio de enfermedad en un modelo de ratón. Se puede inyectar una variante de SIRP- α directamente o indirectamente en el sitio de enfermedad en un ratón, que se puede diseccionar en un momento posterior para detectar la presencia del complejo de la variante de SIRP- α y CD47 en el sitio de enfermedad. Se pueden usar anticuerpos específicos contra la variante de SIRP- α o CD47 en la detección.

Otras Formas de realización

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente que se mencionaron precedentemente en la memoria descriptiva se incorporan a la presente documentación como referencia. Diversas modificaciones y variaciones de las composiciones y métodos descritos de la invención serán evidentes para las personas con experiencia en el arte sin alejarse del alcance y espíritu de la invención. A pesar de que la invención se ha descrito en conexión con formas de realización específicas, ha de comprenderse que la invención tal como se la reivindica no debe limitarse indebidamente a dichas formas de realización específicas. De hecho, las diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que son obvias para las personas con experiencia en el arte, están abarcadas dentro del alcance de la invención. Otras formas de realización están dentro de las siguientes reivindicaciones.

Señor
DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

REF: Expediente No. **NC2016/0000671**, solicitud de patente de invención a favor de **ALX ONCOLOGY INC.** Título: **“CONSTRUCCIONES DE VARIANTES DE SIRP-ALFA Y SUS USOS”**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta al Oficio No. 4902 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado el 19 de junio de 2019.

En respuesta a las observaciones realizadas como resultado del examen de fondo, es pertinente mencionar que las reivindicaciones definen de forma clara y razonablemente general la invención, razón por la que respetuosamente disiento de los comentarios del Señor Examinador a este respecto. A continuación, sin embargo, se incluyen los argumentos y se mencionan las modificaciones realizadas para atender a cada uno de los requerimientos del Señor Examinador:

1. Capítulo Descriptivo

En cuanto a las objeciones del Capítulo Descriptivo, respetuosamente me permito señalarle al Examinador que, por un error involuntario, el Capítulo Descriptivo radicado el **5 de agosto 2016** no corresponde al Capítulo Descriptivo de la presente invención. Por lo tanto, por medio del presente memorial me permito adjuntar el Capítulo Descriptivo correcto el cual describe la invención de manera suficientemente clara y completa para su comprensión y para que una persona medianamente versada en la materia pueda reproducirla. Por todo lo anterior, y siguiendo lo establecido por el Manual Andino de Patentes y la Guía para Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de Utilidad en sus secciones 3.1 y 2.7, respectivamente, el Capítulo Descriptivo Modificado comprende las siguientes secciones:

- El sector tecnológico en la página 1;
- La tecnología anterior conocida por el solicitante que fuese útil en las páginas 1 y 2;

- Una descripción de la invención en término que permitan la comprensión del problema técnico y de la solución aportada por la invención en las páginas 2 a 32;
- Una reseña sobre los dibujos en las páginas 32 a 34;
- Una descripción de la mejor manera conocida por el solicitante para ejecutar o llevar a la práctica la invención en las páginas 34 a 135.

Cabe resaltar que el listado de secuencias, así como las figuras correctas fueron radicadas el **5 de agosto de 2016**.

2. Capítulo Reivindicatorio

En primer lugar, me permito resaltar que el Capítulo Reivindicatorio Modificado de la presente solicitud corresponde al radicado el 10 de agosto del 2018 correspondiente a una modificación voluntaria

Teniendo en cuenta lo anterior, de manera atenta me permito resaltar que las modificaciones realizadas a dicho Capítulo Reivindicatorio no corresponden a una ampliación de la materia originalmente reclamada y encuentran sustento en el capítulo descriptivo de la presente solicitud.

Para futuros casos, agradecemos que su despacho haga uso de la opción de discusiones de **SIPI** para aclarar estos temas que a todas luces obedecen a errores involuntarios y así no perder una oportunidad legal en el artículo 45.

3. Tasa examen

Finalmente, estamos adjuntando una nueva tasa de examen para que se lleve a cabo el examen técnico de la materia reivindicada.

En vista de lo anteriormente expuesto, respetuosamente solicito el retiro de las objeciones de la presente solicitud y la emisión de un segundo examen, ya que en opinión del solicitante el Capítulo Descriptivo Modificado cumple con todos los requisitos establecidos en la Decisión 486.

Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio
- Nuevo Capítulo Descriptivo
- Tasa examen

Atentamente,

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.S.J.

C.C. 80.410.337 de Usaquén Calle 70 A No. 4 – 41