

ANTICUERPOS ANTI-SIRPA Y MÉTODOS DE UTILIZACIÓN DE LOS MISMOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta Solicitud reclama el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 62/676813, presentada el 25 de mayo de 2018, la cual se incorpora como referencia en la presente para cualquier propósito.

LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII y se encuentra incorporada por la presente como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 14 de mayo de 2019, se denomina 40004-PCT SL.txt y tiene un tamaño de 99.798 bytes.

CAMPO

La presente divulgación se relaciona con anticuerpos anti-SIRPA y con los usos terapéuticos de dichos anticuerpos.

ANTECEDENTES

Las células fagocíticas, tales como los macrófagos ($M\Phi$) y las células dendríticas (DCs), distinguen a las células sanas de las células anormales a través de un intrincado conjunto de receptores de la superficie celular que modulan la proliferación, el estado de activación celular, y/o las funciones efectoras. Muchos de estos receptores reconocen diversos ligandos que o bien marcan a las células no deseadas para su eliminación (las denominadas señales “come-me”) o bien protegen a las células normales de la destrucción (las denominadas señales “no-me-comas”). En años recientes, el eje SIRP α —CD47 ha emergido como un determinante crucial en la eliminación programada de

células por parte de los macrófagos en diversos entornos clínicos que van desde la supervivencia de células cancerosas hasta el injerto exitoso de trasplante de células hematopoyéticas. Los agentes terapéuticos que ejercen un impacto en esta vía pueden encontrar una relevante necesidad médica de mejorar la enfermedad con una particular relevancia en muchos tipos de cánceres humanos.

La SIRP α (proteína reguladora de señales- α) pertenece a la familia SIRP de receptores transmembrana, los cuales se expresan primordialmente dentro del linaje de células mieloides (que incluyen M Φ , DCs, granulocitos, etc.) y se caracterizan por una región extracelular que contiene 2 dominios IgC proximales a la membrana y un dominio IgV distal. Único entre esta familia, la SIRP α contiene un motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) intracelular, citoplasmático. Sobre la reticulación de receptores, los sitios del ITIM fosforilado por tirosina atraen y activan a las fosfatasas SHP para regular negativamente las funciones celulares, tales como la fagocitosis o la liberación de citoquinas inflamatorias. CD47 sirve como el principal ligando para la SIRP α , y su amplia expresión en la mayoría de los tipos celulares, incluyendo a las células endoteliales/epiteliales, leucocitos, y eritrocitos, sugiere que éste media una señal “no-me-comas” para proteger a las células sanas del aclaramiento fagocítico. En apoyo de esta visión, diversos estudios muestran que la transferencia adoptiva de glóbulos rojos o de leucocitos a partir de ratones deficientes en CD47 dentro de receptores de tipo salvaje resulta en el rápido aclaramiento de las células deficientes en CD47. A la inversa, el análisis genético posicional de múltiples cepas de ratones inmuno-comprometidos recibiendo células hematopoyéticas humanas identificó al alelo SIRP α en ratones NOD como el factor causal para el injerto exitoso en modelos de xenotrasplante. Los estudios subsiguientes demostraron que la variante alélica de SIRP α expresada solamente en ratones NOD conservó la capacidad de unirse al CD47 humano expresado en células

madre hematopoyéticas humanas, y de este modo, suprime el rechazo de injertos dependientes de macrófagos.

La expresión regulada de SIRP α y CD47 establece un mecanismo de control homeostático para modular la actividad de las células fagocíticas. Por ejemplo, las células apoptóticas regulan hacia abajo la expresión de CD47 para facilitar el envolvimiento por parte de macrófagos residentes mientras las células vivas permanecen ilesas. Del mismo modo, los estímulos inflamatorios, tales como LPS, disminuyen la expresión de SIRP α en los macrófagos y en las células dendríticas (DCs) para potenciar su activación durante la inflamación. Sin embargo, la desregulación de la expresión de SIRP α y CD47 contribuye a las enfermedades asociadas al sistema inmune, como se ve en el cáncer. Diversos tumores aumentan significativamente la expresión de CD47 en relación con células no cancerosas con el objeto de evadir a los mecanismos de vigilancia inmunológica que normalmente eliminan a las células malignas. Los estudios preclínicos revelan que la caída genética de CD47 en modelos de tumores singénicos, tales como el melanoma B16F10, es suficiente para inhibir el crecimiento tumoral en ratones inmunocompetentes. Se han observado resultados similares con líneas celulares cancerosas humanas con CD47 derribado trasplantadas en ratones inmuno-comprometidos. Alternativamente, los agentes biológicos que interrumpen la interacción SIRP α —CD47, tales como los anticuerpos anti-CD47, también mejoran el aclaramiento del tumor en modelos de ratones. Cuando se combinan con anticuerpos de antígenos antitumorales comerciales, tales como trastuzumab o rituximab, los anticuerpos anti-CD47 facilitan un aumento sinérgico en la respuesta antitumoral en comparación con la monoterapia estándar. Aún, dada la expresión ubicua de CD47, los anticuerpos anti-CD47 ponen en riesgo graves cargas de toxicidad debido a los efectos fuera del objetivo que limitan su eficacia terapéutica. Sin embargo, estos estudios

establecen un papel crucial para la vía SIRP α -CD47 en la regulación de las células mieloides con potenciales aplicaciones en la inmunoterapia contra el cáncer.

Los anticuerpos anti-SIRPA se han descrito previamente en, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitudes de Patentes Internacionales Nos: WO2018/057669, WO 2018/026600, WO 2017/178653, WO2017/068164, WO2016/063233, WO2016/205042, WO2015/138600, WO2013/0956352, WO2009/091547, WO2009/131453, y WO2009/046541.

En consecuencia, existe una necesidad de anticuerpos anti-SIRPA terapéuticos para tratar enfermedades, trastornos y afecciones asociados con una actividad de SIRPA no deseada.

Todas las referencias que se citan en la presente, incluyendo a las publicaciones y solicitudes de patentes, se encuentran incorporadas por la presente como referencia en su totalidad.

SÍNTESIS

La presente divulgación generalmente se dirige a composiciones que incluyen anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, quiméricos, humanizados, fragmentos de anticuerpos, etc., que específicamente se unen a SIRPA de humano, y a métodos de utilización de dichas composiciones.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se basan, al menos en parte, en la identificación de anticuerpos anti-SIRPA con características funcionales perfeccionadas y/o mejoradas (por ejemplo, en relación con un anticuerpo anti-SIRPA con una región variable de cadena pesada que comprende a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5, que incluyen, por ejemplo, capacidades perfeccionadas y/o mejoradas de disminución de los niveles

de superficie celular de SIRPA en las células, y/o tener cinética de unión perfeccionada y/o mejorada, y/o tener una KD perfeccionada y/o mejorada, y/o tener valores de EC50 perfeccionados y/o mejorados. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación tienen una KD para SIRPA de humano que es de al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, o al menos 10 veces más baja que un anticuerpo anti-SIRPA que tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación tiene una KD para SIRPA de humano inferior a 6 nM, inferior a 5 nM, inferior a 4 nM, inferior a 3 nM, inferior a 2 nM, inferior a 1 nM, inferior a 0,9 nM, inferior a 0,8 nM, inferior a 0,7 nM, inferior a 0,6 nm, o inferior a 0,5 nM.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación reducen los niveles de expresión de la superficie celular de SIRPA in vitro con una EC50 que es al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, o al menos aproximadamente 50% inferior a un anticuerpo anti-SIRPA que tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5. De modo ventajoso, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación disminuye los niveles celulares de SIRPA in vitro con una concentración efectiva (EC50) media-máxima que tiene un rango desde aproximadamente 0,4 nM hasta aproximadamente 0,5 nM. De modo ventajoso, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación tiene una constante de

disociación (KD) para SIRPA de humano que tiene un rango desde aproximadamente 0,6 nM hasta 0,7 nM.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une a SIRPA v1 de humano. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une a SIRPA v2 de humano. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une a la SIRPB (SIRPbeta) v3 humana. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación no se une a la SIRPB v1 de humano. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación no se une a SIRPA murino. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación no se une a SIRPy de humano. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une a cynoSIRPA. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación no se une a la cynoSIRPB1. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une a SIRPA de mono tití.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo se

une a SIRPA de humano, SIRPA v1 de humano, SIRPA v2 de humano, cyno SIRPA, SIRPA de mono tití, y SIRP β 3 de humano.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende: una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; y una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 22, 23, y 24.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende: una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, y 19.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende: una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; una HVR-H3

que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 22, 23, y 24; una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, y 19.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90% o al menos 95% o al menos 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 33, 34, y 35.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90% o al menos 95% o al menos 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, y 44.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende una, dos, tres o cuatro regiones marco seleccionadas de VH FR1 que comprende la

secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:25, VH FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:26, VH FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:27, y VH FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:28.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena ligera comprende una, dos, tres o cuatro regiones marco seleccionadas de VL FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:29, VL FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:30, VL FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:31, y VL FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:32.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende una, dos, tres o cuatro regiones marco seleccionadas de VH FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:25, VH FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:26, VH FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:27, y VH FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:28; y en donde la región variable de cadena ligera comprende una, dos, tres o cuatro regiones marco seleccionadas de VL FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:29, VL FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:30, VL FR3 que comprende la

secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:31, y VL FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:32.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:33, 34, y 35.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, y 44.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:33, 34, y 35, y en donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, y 44.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de

cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende las HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3 del anticuerpo 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, o 3F9-25 (como se muestra en la Tabla 8).

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena ligera comprende las HVR-L1, HVR-L2, y HVR-L3 del anticuerpo 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, o 3F9-25 (como se muestra en la Tabla 7).

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende las HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3 del anticuerpo 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, o 3F9-25 (como se muestra en la Tabla 8); y en donde la región variable de cadena ligera comprende las HVR-L1, HVR-L2, y HVR-L3 del anticuerpo 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, o 3F9-25 (como se muestra en la Tabla 7).

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3 y una región variable de cadena ligera que comprende una HVR-L1, HVR-L2, y HVR-L3, en donde el anticuerpo comprende las HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, y HVR-L3 del anticuerpo 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, o 3F9-25 (como se muestra en la Tablas 7 y 8).

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende una, dos, tres, o cuatro regiones marco seleccionadas de VH FR1, VH FR2, VH FR3, y VH FR4, en donde: VH FR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:25; VH FR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:26; VH FR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:27; y VH FR4 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:28; y/o la región variable de cadena ligera comprende una, dos, tres, o cuatro regiones marco seleccionadas de VL FR1, VL FR2, VL FR3, y VL FR4, en donde VL FR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:29; VL FR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:30; VL FR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:31; y VL FR4 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:32.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un

anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:49 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:47 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA aislado, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:48 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA aislado, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:49 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA aislado, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de

aminoácidos SEQ ID NO:53 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA aislado, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:54 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA aislado, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:51 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA aislado, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:52 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA aislado, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:55 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA aislado, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:56 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA aislado, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:57 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, o scFv.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un

anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo es un anticuerpo multivalente.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo es de la clase IgG, de la clase IgM, o de la clase IgA.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano en donde el anticuerpo es de la clase IgG y como un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo se une a un receptor de inhibición de Fc. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, el receptor de inhibición de Fc es el receptor de inhibición de Fc-gamma IIB (FcγRIIB).

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo disminuye los niveles celulares de FcγRIIB.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA tiene un isotipo IgG1 humano o de ratón y comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo integrado por: N297A, D265A, D270A, L234A, L235A, G237A, P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S,

E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, y cualquier combinación de los mismos, en donde la numeración de los residuos es de acuerdo con la numeración EU, o comprende una eliminación de aminoácidos en la región Fc en una posición correspondiente a la glicina 236.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc en una posición de residuo seleccionada del grupo integrado por: C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y, y cualquier combinación de los mismos, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos es de acuerdo con la numeración EU.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA disminuye los niveles de la superficie celular de SIRPA, disminuye los niveles intracelulares de SIRPA, disminuye los niveles celulares totales de SIRPA, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA induce la degradación de SIRPA, induce la escisión de SIRPA, induce la internalización de SIRPA, induce el desprendimiento de SIRPA, induce la regulación hacia abajo de la expresión de SIRPA, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo reduce los niveles de la superficie celular de SIRPA *in vitro*.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo reduce los niveles de la superficie celular de SIRPA *in vivo*.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA regula hacia abajo la expresión de SIRPA en monocitos humanos.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA regula hacia abajo la expresión de SIRPA en macrófagos humanos.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA regula hacia abajo la expresión de SIRPA en macrófagos humanos en aproximadamente 70-95%.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo tiene una afinidad (KD) con SIRPA de humano inferior a 6 nM, inferior a 5 nM, inferior a 4 nM, inferior a 3 nM, inferior a 2 nM, o inferior a 1 nM.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo tiene una afinidad (KD) con SIRPA de humano de aproximadamente 0,1 nM a 2 nM.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo tiene una afinidad con SIRPA de humano con una KD que es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, o al menos 10 veces inferior a la afinidad con SIRPA de humano de un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo reduce los niveles de la superficie celular de SIRPA v1 *in vitro* con una concentración efectiva (EC50) media máxima de aproximadamente 0,05 nM a 2 nM o aproximadamente 0,4 nM aproximadamente 0,5 nM según se mide a través de citometría de flujo.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo reduce los niveles de la superficie celular de SIRPA *in vitro* con una concentración efectiva media máxima (EC50) de aproximadamente 0,05 a 0,20 nM para SIRPA v1 de humano, de aproximadamente 0,05 a 0,10 nM para SIRPA v2 de humano,

y/o de aproximadamente 0,05 to 1 nM para la cyno SIRPA según se mide a través de citometría de flujo.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo se une al dominio D3 de SIRPA v1 de humano de la SEQ ID NO:1.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo se une a los residuos de aminoácidos R282, Q284, y G337 de SIRPA v1 de humano de la SEQ ID NO:1.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA aumenta la fagocitosis de las células tumorales en los macrófagos, aumenta la fagocitosis de las células tumorales en los macrófagos M1, aumenta la fagocitosis de las células tumorales en los macrófagos M2, regula hacia abajo la expresión de CD14 en los macrófagos, y/o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA mejora la proliferación de las células T.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA bloquea la interacción o unión de SIRPA con la proteína surfactante D (SP-D).

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA no bloquea la interacción o unión de SIRPA al CD47.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA regula hacia abajo la expresión de la superficie celular de CD32A/B.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA regula hacia abajo la expresión de la superficie celular de CD14.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA mejora la proliferación de las células T sin bloquear la interacción de SIRPy y CD47.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA estimula la producción de ROS en los monocitos y/o aumenta la expresión de IL-8 en los monocitos.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA reduce la cantidad de células mieloides CD14+ en sangre periférica y/o aumenta la cantidad de células mieloides CD14+ en un tumor.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo se une a SIRPA de humano pero no bloquea sustancialmente la unión de CD47 a SIRPA.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo reconoce un primer y un segundo antígeno, en donde el primer antígeno es SIRPA y el segundo antígeno es:

(a) un antígeno que facilita el transporte a través de la barrera hematoencefálica;

(b) un antígeno que facilita el transporte a través de la barrera hematoencefálica seleccionado de receptor de transferrina (TR), receptor de insulina (HIR), receptor del factor de crecimiento tipo insulínico (IGFR), proteínas 1 y 2 relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LPR-1 y 2), y receptor de toxina diftérica;

(c) un agente causante de enfermedades seleccionado de péptidos o proteínas que causan enfermedades, ácidos nucleicos que causan enfermedades, en donde los ácidos nucleicos que causan enfermedades son ARN de expansión repetida GGCCC(G2C4) antisentido, las proteínas que causan enfermedades están seleccionadas de beta amiloide, beta amiloide oligomérica, placas de beta

amiloide, proteína precursora de amiloide o fragmentos de la misma, Tau, IAPP, alfa-sinucleína, TDP-43, proteína FUS, C9orf72 (marco abierto de lectura- región codificante de proteína- número 72 del cromosoma 9), proteína c9RAN, proteína priónica, PrPSc, huntingtina, calcitonina, superóxido dismutasa, ataxina, ataxina 1, ataxina 2, ataxina 3, ataxina 7, ataxina 8, ataxina 10, cuerpos de Lewy, factor natriurético atrial, polipéptido amiloide de los islotes, insulina, apolipoproteína AI, suero amiloide A, medina, prolactina, transtiretina, lisozima, microglobulina beta 2, gelsolina, queratoepitelina, cistatina, AL de cadena ligera de inmunoglobulina, proteína S-IBM, Productos de traducción repetida no asociada a ATG (RAN), Péptidos de repetición dipeptídica (DPR), péptidos de repetición de glicina-alanina (GA), péptidos de repetición de glicina-prolina (GP), péptidos de repetición de glicina-arginina (GR), péptidos de repetición de prolina-alanina (PA), ubiquitina, y péptidos de repetición de prolina-arginina (PR); y

(d) ligandos y/o proteínas expresados en células inmunes, en donde los ligandos y/o proteínas están seleccionados de PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, CD73, y fosfatidilserina; y una proteína, lípido, polisacárido, o glucolípido expresado en una o más células tumorales.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA está conjugado con un péptido que facilita el transporte de través de la barrera hematoencefálica. En algunas realizaciones, el péptido está seleccionado de CRM197, un dominio de transducción de proteínas, TAT, Syn-B, penetratina, un péptido de poli-arginina, un péptido angiopep, y ANG1005.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA es un anticuerpo de opsonización.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA es un anticuerpo conjugado.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA está conjugado con un marcador detectable, una toxina, o un agente terapéutico.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA está conjugado con una toxina seleccionada de ricina, cadena de ricina A, doxorubicina, daunorubicina, un maitansinoide, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxi antracina diona (dihydroxy anthracin dione), actinomicina, toxina diftérica, Pseudomonas exotoxina (PE) A, PE40, abrina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa sarcina, gelonina, mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, caliqueamicina, inhibidor de Saponaria officinalis, glucocorticoide, auristatina, auromicina, itrio, bismuto, combrestatina, duocarmicinas, dolastatina, cc1065, y un cisplatino.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un

anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo anti-SIRPA se utiliza en combinación con uno o más anticuerpos que específicamente unen una proteína causante de enfermedades seleccionadas de beta amiloide, beta amiloide oligomérica, placas beta amiloides, proteína precursora de amiloide o fragmentos de la misma, Tau, IAPP, alfa-sinucleína, TDP-43, proteína FUS, C9orf72 (marco abierto de lectura- región codificante de proteína- número 72 del cromosoma 9), proteína priónica, PrPSc, huntingtina, calcitonina, superóxido dismutasa, ataxina, ataxina 1, ataxina 2, ataxina 3, ataxina 7, ataxina 8, ataxina 10, cuerpos de Lewy, factor natriurético atrial, polipéptido amiloide de los islotes, insulina, apolipoproteína AI, suero amiloide A, medina, prolactina, transtiretina, lisozima, microglobulina beta 2, gelsolina, queratoepitelina, cistatina, AL de cadena ligera de inmunoglobulina, proteína S-IBM, productos de traducción repetida no asociada a ATG (RAN), péptidos de repetición dipeptídica (DPR), péptidos de repetición de glicina-alanina (GA), péptidos de repetición de glicina-prolina (GP), péptidos de repetición de glicina-arginina (GR), péptidos de repetición de prolina-alanina (PA), ubiquitina, y péptidos de repetición de prolina-arginina (PR), y cualquier combinación de los mismos; o con uno o más anticuerpos que unen una proteína inmunomoduladora seleccionada del grupo integrado por: PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, CD73, TREM1, TREM2, CD33, Siglec-5, Siglec-7, Siglec-9, Siglec-11, fosfatidilserina, ácidos nucleicos que causan enfermedades, RNA de expansión repetida de GGCCCC(G2C4) antisentido, y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un método para prevenir, reducir el riesgo, o tratar el cáncer, en donde el método comprende

la administración a un individuo que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, tratando por consiguiente el cáncer. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente invención proporciona un método para prevenir, reducir el riesgo, o tratar a un individuo que tiene una enfermedad, trastorno, o lesión, en donde la enfermedad, trastorno, o lesión es cáncer, comprendiendo el método la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, por consiguiente previniendo, reduciendo el riesgo, o tratando al individuo.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento del cáncer, en donde el método comprende la administración a un individuo que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, en donde el cáncer está seleccionado de sarcoma, cáncer de vejiga, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de pelvis renal, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, melanoma, linfoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, y fibrosarcoma, glioblastoma multiforme; carcinoma renal de células claras; carcinoma adrenocortical; carcinoma urotelial de vejiga, linfoma difuso de células B grandes, adenocarcinoma de pulmón; adenocarcinoma de páncreas, cáncer de células renales, linfoma de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, linfoma indolente de células B, linfoma agresivo de células B, linfoma de células T, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide crónica (CML), mieloma múltiple, síndromes mielodisplásicos, neoplasias mieloproliferativas, carcinoma de mama

invasivo, carcinoma cervical de células escamosas, adenocarcinoma endocervical, colangiocarcinoma, adenocarcinoma de colon, linfoma difuso de células B grandes, carcinoma esofágico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cromóforo renal, carcinoma papilar de células renales, glioma de bajo grado, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas de pulmón, mesotelioma, cistoadenocarcinoma seroso ovárico, adenocarcinoma de páncreas, feocromocitoma y paraganglioma, adenocarcinoma de próstata, adenocarcinoma de recto, melanoma cutáneo, adenocarcinoma de estómago, tumores de células germinales testiculares, carcinoma de tiroides, timoma, carcinoma endometrial del cuerpo uterino, carcinosarcoma uterino, y melanoma uveal.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento del cáncer, en donde el método comprende la administración a un individuo que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, el método comprende además la administración de un agente terapéutico que inhibe PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, o CD73. En algunas realizaciones ello puede combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, el agente terapéutico es un anticuerpo que inhibe PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, o CD73.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un método

de tratamiento del cáncer, en donde el método comprende la administración a un individuo que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, comprendiendo el método la administración al individuo de al menos un anticuerpo que específicamente se une a una molécula inhibidora de punto de control, y/o una o más terapias anticancerígenas estándar o de investigación. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, el al menos un anticuerpo que específicamente se une a una molécula inhibidora de punto de control se administra en combinación con el anticuerpo anti-SIRPA. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, el al menos un anticuerpo que específicamente se une a una molécula inhibidora de punto de control está seleccionado de un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-CTLA4, un anticuerpo anti-PD-L2, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-B7-H3, un anticuerpo anti-B7-H4, y anticuerpo anti-HVEM, un anticuerpo atenuador anti-linfocitos B y T (BTLA), un anticuerpo anti receptor inhibidor asesino (KIR), un anticuerpo anti-GAL9, un anticuerpo anti-TIM-1, un anticuerpo anti-TIM3, un anticuerpo anti-TIM-4, un anticuerpo anti-A2AR, un anticuerpo anti-CD39, un anticuerpo anti-CD73, un anticuerpo anti-LAG-3, un anticuerpo anti-fosfatidilserina, un anticuerpo anti-CD27, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-TNF α , un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-Siglec-5, un anticuerpo anti-Siglec-7, un anticuerpo anti-Siglec-9, un anticuerpo anti-Siglec-11, un anticuerpo antagonístico anti-TREM1, un anticuerpo antagonístico anti-TREM2, un anticuerpo anti-TIGIT, un anticuerpo anti-VISTA, un anticuerpo anti-CD2, un anticuerpo anti-CD5, y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, las una o más terapias anticancerígenas

estándar o de investigación están seleccionadas de radioterapia, quimioterapia citotóxica, terapia dirigida, terapia con imatinib, terapia con trastuzumab, terapia con etanercept, terapia de transferencia celular adoptiva (ACT), terapia de transferencia de células T del receptor de antígeno quimérico (CAR-T), terapia con vacunas, y terapia con citoquinas.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento del cáncer, en donde el método comprende la administración a un individuo que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, en donde el método comprende además la administración al individuo de al menos un anticuerpo que específicamente se une a una citoquina inhibidora. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, el al menos un anticuerpo que específicamente se une a una citoquina inhibidora se administra en combinación con el anticuerpo anti-SIRPA. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, el al menos un anticuerpo que específicamente se une a una citoquina inhibidora está seleccionado de un anticuerpo anti-CCL2, un anticuerpo anti-CSF-1, un anticuerpo anti-IL-2, y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento del cáncer, en donde el método comprende la administración a un individuo que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, en donde el método comprende además la administración al individuo de al menos un anticuerpo agonístico que específicamente se une a una proteína estimuladora de punto de control. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las

realizaciones en la presente, el al menos un anticuerpo agonístico que específicamente se une a una proteína estimuladora de punto de control se administra en combinación con el anticuerpo anti-SIRPA. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, el al menos un anticuerpo agonístico que específicamente se une a una proteína estimuladora de punto de control está seleccionado de un anticuerpo agonista anti-CD40, un anticuerpo agonista anti-OX40, un anticuerpo agonista anti-ICOS, un anticuerpo agonista anti-CD28, un anticuerpo agonístico anti-TREM1, un anticuerpo agonístico anti-TREM2, un anticuerpo agonista anti-CD137/4-1BB, un anticuerpo agonista anti-CD27, un anticuerpo agonista anti-proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides GITR, un anticuerpo agonista anti-CD30, un anticuerpo agonista anti-BTLA, un anticuerpo agonista anti-HVEM, un anticuerpo agonista anti-CD2, un anticuerpo agonista anti-CD5, y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento del cáncer, en donde el método comprende la administración a un individuo que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, comprendiendo el método además la administración al individuo de al menos una citoquina estimuladora. En algunas realizaciones, la al menos una citoquina estimuladora está seleccionada de IFN- α 4, IFN- β , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, CRP, miembros de la familia IL-20, LIF, IFN- γ , OSM, CNTF, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, CXCL10, IL-33, MCP-1, MIP-1-beta, y cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica a un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación. En algunas realizaciones, la

presente invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica a un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una célula huésped aislada que comprende un vector que comprende un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica a un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método de producción de un anticuerpo que se une a SIRPA de humano, en donde el método comprende el cultivo de una célula huésped que comprende un vector que comprende un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica a un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación de modo que se produzca el anticuerpo. La presente invención proporciona además la recuperación del anticuerpo producido por la célula.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1** muestra la alineación de secuencias de aminoácidos de los dominios extracelulares de proteínas SIRPA y SIRPA de humano variante 1 a partir de varias especies. El porcentaje de identidad registrado demuestra una alta homología dentro de la región extracelular. Los números de acceso son P78324 (SIRPA de humano variante 1), XP015313153 (mono cynomolgus), JAB51896 (mono tití), G1U0I5 (conejo), y XP005634938 (perro). La **FIG. 1** divulga las SEQ ID NOS 59-63, respectivamente, en orden de aparición.

La **FIG. 2A** enumera potenciales secuencias humanizadas del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-SIRPA 3F9. La secuencia humanizada se basa en el marco aceptor de IGHV3-23*01 y la región de unión de IGHJ4*01. La **FIG. 2A** divulga las SEQ ID NOS 64-65, 2, 64, y 3-4, respectivamente, en orden de aparición. La **FIG. 2B** enumera potenciales secuencias humanizadas del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-SIRPA 3F9. La **FIG. 2B** divulga las SEQ ID NOS 66-67, 5, 66, y 68-70, respectivamente, en orden de aparición.

La **FIG. 3** expone datos que muestran la regulación hacia abajo de SIRPA mediada por anticuerpos en los macrófagos humanos primarios mediante anticuerpos anti-SIRPA 3F9 murinos y humanizados.

La **FIG. 4A** expone datos que muestran que la regulación hacia abajo del receptor mediada por anticuerpos depende del glicano Fc unido a N. La **FIG. 4B** expone datos que muestran que el mejoramiento mediado por anticuerpos de la fagocitosis de las células tumorales depende del glicano Fc unido a N.

La **FIG. 5A** expone datos que muestran que las variantes de los anticuerpos anti-SIRPA 3F9 IgG4 humanizados falló en inducir la fagocitosis de las células tumorales. La **FIG. 5B** expone datos que muestran que las variantes de los anticuerpos anti-SIRPA 3F9 IgG4 humanizados falló en regular hacia abajo la expresión de CD14 en los macrófagos.

La **FIG. 6A** muestra que el tratamiento con anticuerpo anti-SIRPA 3F9 mIgG1 regula hacia abajo la expresión de CD32A/B en los macrófagos humanos primarios. La **FIG. 6B** muestra que el tratamiento con anticuerpo anti-SIRPA 3F9 regula hacia abajo la expresión de CD32A y CD32B en los macrófagos humanos primarios.

La **FIG. 7A** expone datos que muestran que el bloqueo de CD32A/B inhibe la regulación hacia abajo de SIRPA mediada por el anticuerpo anti-SIRPA 3F9 en

los macrófagos humanos primarios. La **FIG. 7B** expone datos que muestran que el bloqueo de CD32A/B inhibe el mejoramiento de la fagocitosis de las células tumorales mediado por el anticuerpo anti-SIRPA 3F9.

La **FIG. 8** expone datos que muestran que el alotipo CD32A afectó la regulación hacia abajo de SIRPA mediada por el anticuerpo anti-SIRPA 3F9. La **FIG. 8A** muestra que los donantes 507 y 508 fueron los heterocigotos CD32A-R/H131; la **FIG. 8B** muestra que los donantes 516 y 517 fueron los homocigotos CD32A-H/H131.

La **FIG. 9A-9B** expone datos que muestran que la regulación hacia abajo del receptor mediada por anticuerpos conduce a la degradación de SIRPA. En la **FIG. 9A**, se cargaron 5 µg, 10 µg, y 20 µg de lisado de células enteras sobre electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y se sometió a inmunoblot con dominio citoplasmático anti-SIRPA (α-SIRPAct). En la **FIG. 9B**, se cargaron 20 µg de lisado de células enteras sobre SDS-PAGE y se sondeó con α-SIRPAct y anti-SHP2.

La **FIG. 10A-10B** expone datos que comparan el mejoramiento de la actividad fagocítica de diferentes variantes de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22. En la **FIG. 10A**, se trataron macrófagos humanos primarios con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 en una columna vertebral de IgG1 humana de tipo salvaje o en una IgG1 humana que soporta a las mutaciones de Fc S267E/L328F o un anticuerpo de control de isotipo. En la **FIG. 10B**, se trataron macrófagos humanos primarios con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 en una columna vertebral de IgG1 humana que soporta a las mutaciones de Fc S267E/L328F o A330S/P331S o un anticuerpo de control de isotipo.

La **FIG. 11A-11B** expone datos que comparan la actividad fagocítica de diferentes variantes de Fc de anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 en relación con anti-CD47 en los macrófagos M1 (la **FIG. 11B**) y M2 (la **FIG. 11A**).

La **FIG. 12A** y la **FIG. 12B** exponen datos que muestran que los macrófagos tratados con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 redujeron la viabilidad de las células tumorales sólidas *in vitro*.

La **FIG. 13A** expone datos que comparan el mejoramiento de la proliferación de las células T a través de diferentes variantes de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 en un ensayo de Reacción de Linfocitos Mixtos (MLR) de 2 vías. La **FIG. 13B** expone datos que comparan el mejoramiento de la proliferación de las células T a través de diferentes variantes de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 y anticuerpo anti-SIRPA 3F9-14 en relación con anti-CD47 IgG4 en un ensayo de Reacción de Linfocitos Mixtos (MLR) de 2 vías.

La **FIG. 14A** expone datos que comparan el mejoramiento de la proliferación de las células T a través de diferentes variantes de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 en relación con anti-CD47 IgG4 en un ensayo MLR de 1 vía. La **FIG. 14B** muestra un gráfico representativo de FACS a partir del ensayo MLR de 1 vía.

La **FIG. 15A** y la **FIG. 15B** exponen datos que comparan el mejoramiento de la liberación de TNF a través de diferentes variantes de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 por medio de macrófagos cebados con LPS.

La **FIG. 16** expone datos que muestran la identificación y visualización de residuos “críticos” para los anticuerpos anti-SIRPA en un modelo de SIRPA de humano.

La **FIG. 17A-17C** expone datos que muestran el efecto del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 en la inhibición del crecimiento tumoral en combinación con el anticuerpo anti-PD-L1 en un modelo singénico de carcinoma de colon de ratón. La **FIG. 17A** expone histogramas de FACS que muestran la expresión de CD47 de ratón (panel superior) y CD47 de humano (panel inferior) en líneas celulares MC38 de tipo salvaje sometidas a ingeniería. La **FIG. 17B** expone datos que

muestran que las curvas de crecimiento tumoral promedio de ratones transgénicos huSIRPA/huCD47 BAC implantados por vía subcutánea con células MC38 sometidas a ingeniería carecen de la expresión de CD47 de ratón y que sobreexpresan CD47 de humano (MC38-mCD47KO/huCD47+). La FIG. 17C expone diagramas de espaghetis de cada animal individual en cada grupo de tratamiento de la FIG. 17B.

La FIG. 18A-18B expone datos que muestran la cinética de la regulación hacia abajo de SIRPA mediada por anticuerpos en células mieloides de ratones transgénicos BAC portadores de tumores tratados con dosis en aumento de anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación. La FIG. 18A expone datos que muestran el cambio relativo en la expresión de SIRPA a través del tiempo en células mieloides infiltrantes de tumores. La FIG. 18B expone datos que muestran el cambio relativo en la expresión de SIRPA a través del tiempo en células mieloides esplénicas.

La FIG. 19A muestra las condiciones de tratamiento del estudio de la regulación hacia abajo de SIRPA mediada por el anticuerpo anti-SIRPA en ratones NOG-EXL humanizados portando los tumores A375. La FIG. 19B expone datos que muestran el nivel de expresión de SIRPA en macrófagos de tumores humanos como valores de MFI (panel de la izquierda) o valores normalizados (panel de la derecha) asociados con el tratamiento con los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación.

La FIG. 20A-20B muestra los niveles de expresión de los marcadores de macrófagos M1 HLA-DR/MHC clase 2 (FIG. 20A) y CD86 (FIG. 20B) en macrófagos de tumores humanos aislados a partir de ratones NOG-EXL humanizados portando los tumores A375 luego del tratamiento con los anticuerpos anti-SIRPA de la presente invención. La FIG. 20A y la FIG. 20B exponen datos que muestran la expresión de HLA-DR/MHC clase 2 y CD86,

respectivamente, como los valores de MFI (paneles de la izquierda) o como valores normalizados (paneles de la derecha).

La FIG. 21A-21B muestra la regulación hacia abajo de SIRPA de humano en monocitos esplénicos (FIG. 21A) y en monocitos de sangre periférica (FIG. 21B) aislados a partir de ratones NOG-EXL humanizados portando los tumores A375 asociados con la administración de los anticuerpos anti-SIRPA de la presente invención. La FIG. 21A y la FIG. 21B exponen datos que muestran la expresión de SIRPA de humano como valores de MFI (paneles de la izquierda) o como valores normalizados (paneles de la derecha).

La FIG. 22 expone datos que muestran la regulación hacia abajo de SIRPA mediada por anticuerpos en macrófagos humanos primarios por medio de diferentes variantes de Fc de anticuerpos anti-SIRPA 3F9-22.

La FIG. 23 expone datos que comparan el mejoramiento de la actividad fagocítica de diferentes variantes de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 en comparación con los anticuerpos de bloqueo anti-CD47.

La FIG. 24 expone datos que muestran recuentos de glóbulos rojos y plaquetas en monos cynomolgus a los que se les administró anticuerpo IgG de control, anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 PS, anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 IgG4, y anticuerpo anti-SIRPA 3F9-IgG2, y anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 NSLF.

Debe comprenderse que una, algunas, o todas las propiedades de las diversas realizaciones descritas en la presente pueden combinarse para formar otras realizaciones de la presente invención. Estos y otros aspectos de la invención se tornarán evidentes para el experto en la técnica. Estas y otras realizaciones de la invención se describen más aún por medio de la descripción detallada que sigue.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación se relaciona con anticuerpos anti-SIRPA (por ejemplo, anticuerpos monoclonales); métodos de elaboración y utilización de dichos anticuerpos; composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos; ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos; y células huésped que comprenden ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos.

Las técnicas y procedimientos que se describen o a los que se hace referencia en la presente generalmente se comprenden bien y comúnmente se emplean utilizando la metodología convencional por parte de los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las ampliamente utilizadas metodologías descritas en Sambrook et al., *Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio* 3era. edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; *Protocolos Actuales en Biología Molecular* (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); las series de publicaciones *Métodos en Enzimología* (Academic Press, Inc.): PCR 2: *Un Enfoque Práctico* (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *Anticuerpos, Un Manual de Laboratorio, y Cultivo de Células Animales* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Síntesis de Oligonucleótidos* (M.J. Gait, ed., 1984); *Métodos en Biología Molecular*, Humana Press; *Biología Celular: Un Cuaderno de Laboratorio* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Cultivo de Células Animales* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introducción al Cultivo Celular y Tisular* (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cultivo Celular y Tisular: Procedimientos de Laboratorio* (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley e Hijos; *Manual de Inmunología Experimental* (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); *Vectores de Transferencia de Genes para Células de Mamíferos* (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); *RCP: La Reacción en Cadena de la Polimerasa*, (Mullis et al., eds., 1994); *Protocolos Actuales en Inmunología* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Protocolos Cortos en Biología Molecular* (Wiley e Hijos, 1999); *Inmunobiología* (C.A. Janeway y P.

Travers, 1997); *Anticuerpos* (P. Finch, 1997); *Anticuerpos: Un Enfoque Práctico* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Anticuerpos Monoclonales: Un Enfoque Práctico* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Utilizando Anticuerpos: Un Manual de Laboratorio* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *Los Anticuerpos* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cáncer: Principios y Práctica de Oncología* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

I. **Definiciones**

Los términos “SIRPα” o “polipéptido de SIRPα” o “SIRPA” o “polipéptido de SIRPA” se utilizan indistintamente en la presente para referirse en la presente a cualquier SIRPA nativo a partir de cualquier fuente de vertebrados, incluyendo mamíferos tales como primates (*por ejemplo*, humanos y cynos) y roedores (*por ejemplo*, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. En algunas realizaciones, el término abarca ambas secuencias de tipo salvaje y secuencias de variantes que se producen en forma natural, *por ejemplo*, variantes de empalme o variantes alélicas. En algunas realizaciones, el término abarca SIRPA no procesado, “de longitud completa” así como también cualquier forma de SIRPA que resulte del procesamiento en la célula. En algunas realizaciones, el SIRPA es SIRPA de humano. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de un SIRPA ejemplificativo es Acceso de Uniprot No. P78324 a partir del 25 de abril 2018. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de un SIRPA v1 de humano ejemplificativo es la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de un SIRPA v2 de humano ejemplificativo es GenBank CAA71403.

Los términos “anticuerpo anti-SIRPA”, un “anticuerpo que se une a SIRPA”, y “anticuerpo que específicamente se une a SIRPA” se refieren a un anticuerpo

que es capaz de unirse a SIRPA con suficiente afinidad tal que el anticuerpo sea útil como un agente terapéutico y/o de diagnóstico en la focalización de SIRPA. En una realización, la extensión de la unión de un anticuerpo anti-SIRPA a un polipéptido no-SIRPA, no relacionado es inferior a aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo a SIRPA según se mide, *por ejemplo*, a través de un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a SIRPA tiene una constante de disociación (KD) de $< 1 \mu\text{M}$, $< 100 \text{ nM}$, $< 10 \text{ nM}$, $< 1 \text{ nM}$, $< 0,1 \text{ nM}$, $< 0,01 \text{ nM}$, o $< 0,001 \text{ nM}$ (*por ejemplo*, 10^{-8} M o menor, *por ejemplo* de 10^{-8} M a 10^{-13} M , *por ejemplo*, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA se une a un epítipo de SIRPA que se encuentra conservado entre SIRPA a partir de diferentes especies.

Con respecto a la unión de un anticuerpo a una molécula diana o blanco, el término “unión específica” o “que específicamente se une a” o es “específico para” un blanco de polipéptido particular o de un epítipo sobre un polipéptido particular significa una unión que es diferente en términos mensurables de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, *por ejemplo*, mediante la determinación de la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control. *Por ejemplo*, la unión específica puede determinarse *por medio* de la competición con una molécula de control que es similar al blanco, *por ejemplo*, un exceso de blanco no marcado. En este caso, se indica la unión específica si la unión del blanco marcado a una sonda está inhibida competitivamente *por el exceso de blanco no marcado*. El término “unión específica” o “que específicamente se une a” o es “específico para” un blanco de polipéptido particular o de un epítipo sobre un polipéptido particular como se usa en la presente puede exponerse, *por ejemplo*, *por medio* de una molécula que tiene una KD para el blanco de aproximadamente cualquiera de 10^{-4} M o más baja, 10^{-5} M o más baja, 10^{-6} M o más baja, 10^{-7} M o más baja, 10^{-8} M o más

baja, 10^{-9} M o más baja, 10^{-10} M o más baja, 10^{-11} M o más baja, 10^{-12} M o más baja o una KD en el rango de 10^{-4} M a 10^{-6} M o 10^{-6} M a 10^{-10} M o 10^{-7} M a 10^{-9} M. Según se apreciará por el experto en la técnica, los valores de afinidad y de KD están inversamente relacionados. Una alta afinidad para un antígeno se mide por medio de un valor de KD bajo. En una realización, el término “unión específica” se refiere a una unión donde una molécula se une a un polipéptido particular o a un epítipo sobre un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

El término “*inmunoglobulina*” (Ig) se usa indistintamente con “*anticuerpo*” en la presente. El término “anticuerpo” en la presente se usa en el sentido más amplio y especialmente abarca a los anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos) que incluyen aquéllos formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre que ellos presenten la actividad biológica deseada.

Los “anticuerpos nativos” son usualmente las glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (“L”) idénticas y dos cadenas pesadas (“H”) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por medio de un enlace disulfuro covalente, mientras que la cantidad de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por una cantidad de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio

variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, *Inmunología Básica y Clínica*, 8va Ed., Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

A la cadena ligera a partir de cualquier especie de vertebrado se le puede asignar uno o dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas pueden ser asignadas a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, que tienen a las cadenas pesadas designadas alfa (α), delta (δ), epsilon (ϵ), gamma (γ), y mu (μ), respectivamente. Las clases γ y α están además divididas en las subclases (isotipos) sobre la base de diferencias relativamente menores en la función y secuencia de CH, por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas y se describen generalmente en, por ejemplo, Abbas *et al.*, *Inmunología Celular y Molecular*, 4ta ed. (W.B. Saunders Co., 2000).

La “región variable” o “dominio variable” de un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Se puede hacer referencia a los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera como “VH” y “VL”, respectivamente. Estos dominios son generalmente las partes

más variables del anticuerpo (en relación con otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de unión al antígeno.

El término “variable” se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre los anticuerpos, tales como los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación. El dominio variable media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida de manera uniforme a través del lapso completo de los dominios variables. En cambio, ésta está concentrada en tres segmentos denominados hiperregiones variables (HVRs) tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las regiones marco (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprende cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de hoja beta, conectada por tres HVRs, las cuales forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de hoja beta. Las HVRs en cada cadena se mantienen juntas en cercana proximidad por medio de las regiones FR y, con las HVRs a partir de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Secuencias de Interés Inmunológico*, Quinta Edición, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están involucrados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-SIRPA monoclonal de la presente divulgación, obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población

son idénticos excepto por posibles modificaciones post-traducción y/o mutaciones que se producen en forma natural (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones, etc.) que pueden encontrarse presentes en menores cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un sitio antigénico único. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en el sentido que ellos son sintetizados por medio del cultivo de hibridomas, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo según se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como requiriendo la producción del anticuerpo a través de cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizarse de acuerdo con la presente invención pueden ser elaborados a través de una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, el método del hibridoma, métodos de ADN recombinante, y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tienen partes o todos los genes o sitios de inmunoglobulina humana que codifican a las secuencias de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizarse de acuerdo con la presente divulgación pueden ser elaborados por medio de una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, tecnologías de visualización de fagos (véase, por ejemplo, Clackson et al., *Naturaleza*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat’l Acad. Sci. Estados Unidos* 101(34):12467-472 (2004); y Lee et al., *J. Métodos de Inmunol.* 284(1-2):119-132 (2004), el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein.,

Naturaleza, 256:495-97 (1975); Hongo et al., Hibridoma, 14 (3):253-260 (1995), Harlow et al., Anticuerpos: Un Manual de Laboratorio, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2da ed. 1988); Hammerling et al., en: Anticuerpos Monoclonales e Hibridomas de Células T 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), métodos de ADN recombinante (véase, *por ejemplo*, la Patente de los Estados Unidos No. 4.816.567), tecnologías de presentación de levaduras (véase, *por ejemplo*, WO2009/036379A2; WO2010105256; WO2012009568, y Xu et al., Ing. de las Proteínas Des. Sel., 26(10): 663-70 (2013), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tienen partes o todos los genes o sitios de inmunoglobulina humana que codifican a las secuencias de inmunoglobulina humana (véase, *por ejemplo*, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. Estados Unidos 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Naturaleza 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Año en Inmunol. 7:33 (1993); Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks et al., Bio/Tecnología 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Naturaleza 368:856-859 (1994); Morrison, Naturaleza 368:812-813 (1994); Fishwild et al., Biotecnol. de la Naturaleza 14:845-851 (1996); Neuberger, Biotecnol. de la Naturaleza 14:826 (1996); y Lonberg y Huszar, Rev. Intern. de Inmunol. 13:65-93 (1995).

Los términos “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” o “anticuerpo completo” se utilizan indistintamente para referirse a un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, en su forma sustancialmente intacta, en oposición a un fragmento de anticuerpo. Específicamente, los anticuerpos completos incluyen a aquéllos con cadenas pesadas y ligeras que incluyen una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (*por ejemplo*, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencias de aminoácidos de los

misimos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.

Un “fragmento de anticuerpo” se refiere a una molécula distinta a un anticuerpo intacto que comprende a una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al cual se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen a los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la Patente de los Estados Unidos 5641870, Ejemplo 2; Zapata et al., *Ing. de las Proteínas* 8(10):1057-1062 (1995)); moléculas de anticuerpos de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión de papaína de los anticuerpos, tales como los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación, produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, y un fragmento “Fc” residual, una denominación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consta de una cadena ligera completa junto con el dominio de la región variable de la cadena pesada (VH), y el primer dominio constante de una cadena pesada (CH1). Cada fragmento de Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión al antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento F(ab')₂ largo el cual aproximadamente corresponde a dos fragmentos Fab unidos por enlace disulfuro que tiene diferente actividad de unión a antígeno y que aún es capaz de entrecruzarse con un antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab al tener unos pocos residuos adicionales en el término carboxi del dominio CH1 incluyendo una o más cisteínas a partir de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente para Fab' en el cual el(os) residuo(s) de cisteínas de los dominios constantes soportan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de los

fragmentos Fab' los cuales tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de los fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxi-terminales de ambas cadenas pesadas sostenidas conjuntamente por medio de disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan por medio de secuencias en la región Fc, la región que también es reconocida por los receptores Fc (FcR) que se encuentran en ciertos tipos de células.

Los "fragmentos funcionales" de anticuerpos, tales como los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación, comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que generalmente incluye la región variable o de unión a antígeno del anticuerpo intacto o la región Fc de un anticuerpo que mantiene o que ha modificado la capacidad de unión a FcR. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen anticuerpo lineal, moléculas de anticuerpos de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con enlazadores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios VH y VL de modo tal que se logre el emparejamiento inter-cadena pero no intra-cadena de los dominios variables, resultando por consiguiente en un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "de recombinación" en los cuales los dominios VH y VL de los dos anticuerpos se encuentran presentes en diferentes cadenas de polipéptidos.

Como se usa en la presente, un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo (inmunoglobulina), tal como un anticuerpo anti-SIRPA quimérico de la presente divulgación, en el cual una porción de la cadena pesada y/o ligera es

idéntica con u homóloga con las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados a partir de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el(os) resto(s) de la(s) cadena(s) es(son) idéntico(s) con u homólogo(s) con las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados a partir de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que ellos presenten la actividad biológica deseada. Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente incluyen a los anticuerpos PRIMATIZED® en donde la región de unión al antígeno del anticuerpo se deriva a partir de un anticuerpo producido por, *por ejemplo*, la inmunización de monos macacos con un antígeno de interés. Como se usa en la presente, “anticuerpo humanizado” se usa como un subconjunto de “anticuerpos quiméricos.”

Las formas “humanizadas” de los anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, murinos), tales como las formas humanizadas de los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación, son los anticuerpos quiméricos que comprenden residuos de aminoácidos a partir de HVRs no humanas y residuos de aminoácidos a partir de FRs humanas. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas de las HVRs (*por ejemplo*, CDRs) corresponden a aquéllas de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas de las FRs corresponden a aquéllas de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante de anticuerpos derivada a partir de un anticuerpo humano. Una “forma humanizada” de un anticuerpo, *por ejemplo*, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a aquélla de un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, producido por un humano y/o que ha sido elaborado utilizando cualquiera de las técnicas para la elaboración de anticuerpos humanos según se divulga en la presente. Esta definición de un anticuerpo humano específicamente excluye a un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse utilizando varias técnicas conocidas en la materia, que incluyen bibliotecas de visualización de fagos y bibliotecas de visualización de levaduras. Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración del antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a un desafío antigénico, pero cuyos sitios endógenos han sido inhabilitados, *por ejemplo*, xenoratos inmunizados así como también generados a través de una tecnología de hibridoma de células B humanas. Los anticuerpos humanos pueden producirse utilizando diversas técnicas conocidas en la materia, que incluyen bibliotecas de visualización de fagos. Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos humanos monoclonales los métodos descritos en Cole et al., Anticuerpos Monoclonales y Terapia para el Cáncer, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, Opin. Act. de Farmacol. 5:368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración del antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a un desafío antigénico, pero cuyos sitios endógenos han sido inhabilitados, *por ejemplo*, xenoratos inmunizados (véase, *por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la Tecnología XENOMOUSE™). Véase también, *por ejemplo*, Li et al.,

Proc. Nat'l Acad. Sci. Estados Unidos, 103:3557-3562 (2006) con respecto a los anticuerpos humanos generados a través de una tecnología de hibridoma de células B humanas. Alternativamente, los anticuerpos humanos también pueden prepararse mediante el empleo de métodos y bibliotecas de levaduras según se divulga en, por ejemplo, WO2009/036379A2; WO2010105256; WO2012009568; y Xu et al., Ing. de las Proteínas Des. Sel., 26(10): 663-70 (2013).

El término “*región hipervariable*”, “*HVR*”, o “*HV*”, cuando se utiliza en la presente se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo, tales como aquéllas de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVRs; tres en VH (H1, H2, H3), y tres en VL (L1, L2, L3). En los anticuerpos nativos, H3 y L3 despliegan la mayor diversidad de las seis HVRs, y se cree que H3 en particular juega un rol único en conferirle fina especificidad a los anticuerpos. Los anticuerpos de camélidos que se producen en forma natural que constan de una cadena pesada solamente son funcionales y estables en ausencia de una cadena ligera.

Se encuentran en uso una cantidad de delineaciones de HVR y están comprendidas en la presente. En algunas realizaciones, las HVRs pueden ser regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de Kabat basadas en la variabilidad de las secuencias y son las más comúnmente utilizadas (Kabat et al., *supra*). En algunas realizaciones, las HVRs pueden ser CDRs de Chothia. Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). En algunas realizaciones, las HVRs pueden ser HVRs de AbM. Las HVRs de AbM representan un compromiso entre las CDRs de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y son utilizadas por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. En algunas realizaciones, las HVRs pueden ser HVRs “de contacto”. Las HVRs “de contacto” se basan en un

análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos a partir de cada una de estas HVRs se indican a continuación.

<u>Bucle</u>	<u>Kabat</u>	<u>AbM</u>	<u>Chothia</u>	<u>Contacto</u>
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVRs pueden comprender “HVRs extendidas” como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2), y 89-97 o 89-96 (L3) en VL, y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (una realización preferida) (H2), y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en VH. Los residuos de los dominios variables se numeran de acuerdo con Kabat et al., *supra*, para cada una de estas definiciones de HVR extendida.

Los residuos “*marco*” o “*FR*” son aquellos residuos de dominio variable distintos a los residuos de HVR según se define en la presente.

La frase “numeración de los residuos de dominio variable como en EU o Kabat” o “numeración de las posiciones de los aminoácidos como en EU o Kabat”, y las variaciones de la misma, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en EU o Kabat et al., *supra*. Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento de, o inserción dentro de, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácidos (el residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2

y residuos insertados (*por ejemplo*, los residuos 82a, 82b, y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración EU o Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo determinado mediante la alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat “estándar”.

El sistema de numeración EU o Kabat generalmente se utiliza cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (*por ejemplo*, Kabat et al., Secuencias de Interés Inmunológico. 5ta Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1991)). El “sistema de numeración EU o Kabat” o “índice de EU” generalmente se utiliza cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (*por ejemplo*, el índice de EU informado en Kabat et al., supra). El “índice de EU como en Kabat” se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo de EU de IgG1 humano. A menos que se manifieste de otra manera en la presente, las referencias a los números de los residuos en el dominio variable de los anticuerpos significan la numeración de los residuos por medio del sistema de numeración de Kabat. A menos que se manifieste de otra manera en la presente, referencias a los números de los residuos in el dominio constante de anticuerpos implica la numeración de los residuos mediante el sistema de numeración EU o Kabat (*por ejemplo*, véase La Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2010-280227).

Un “*marco humano aceptor*” como se usa en la presente es un marco que comprende a la secuencia de aminoácidos de un marco de VL o VH derivado a partir de un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano. Un marco humano aceptor “derivado a partir de” un marco de inmunoglobulina humana o de un marco de consenso humano puede comprender la misma

secuencia de aminoácidos de los mismos, o éste puede comprender cambios en la secuencia de aminoácidos preexistentes. En algunas realizaciones, la cantidad de cambios de aminoácidos preexistentes son de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. Donde se encuentran presentes los cambios de aminoácidos preexistentes en un VH, con preferencia esos cambios ocurren solamente en tres, dos, o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácidos en esas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, el marco humano aceptor de VL es idéntico en secuencia a la secuencia del marco de inmunoglobulina humana de VL o a la secuencia del marco de consenso humano.

Un “*marco de consenso humano*” es un marco que representa a los residuos de aminoácidos que ocurren más comúnmente en una selección de secuencias marco de VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de las secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es a partir de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., *Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico*, 5ta Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (1991). Los ejemplos incluyen para el VL, el subgrupo puede ser subgrupo kappa I, kappa II, kappa III or kappa IV como en Kabat *et al.*, *supra*. Adicionalmente, for the VH, el subgrupo puede ser el subgrupo I, subgrupo II, o subgrupo III como en Kabat *et al.*, *supra*.

Una “*modificación de aminoácidos*” en una posición especificada, *por ejemplo*, de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, se refiere a la sustitución o supresión del residuo especificado, o a la inserción de al menos un residuo de aminoácido adyacente al residuo especificado. La inserción “*adyacente*” a un residuo especificado significa la inserción dentro de uno o dos residuos del mismo. La inserción puede ser N-terminal o C-terminal al residuo

especificado. La modificación de aminoácidos preferida en la presente es una sustitución.

Un anticuerpo “*de afinidad madurada*”, tal como un anticuerpo anti-SIRPA de afinidad madurada de la presente divulgación, es uno con una o más alteraciones en una o más HVRs del mismo que resultan en un mejoramiento en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa(s) alteracion(es). En una realización, un anticuerpo de afinidad madurada tiene afinidades nanomolares o aún picomolares para el antígeno blanco. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen a través de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks et al. *Bio/Tecnología* 10:779-783 (1992) describe la maduración de la afinidad por medio del barajado de los dominios VL y VH. La mutagénesis aleatoria de HVR y/o de los residuos marco se describe por, por ejemplo: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. Estados Unidos* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gen* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al. *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

“Fv” es el mínimo fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de enlace y de reconocimiento de antígenos completo. Este fragmento consta de un dímero de dominio de región variable de una cadena pesada y de una cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno a partir de la cadena H y L) que contribuyen a que los residuos de aminoácidos se unan a los antígenos y le confieran al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, aún un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres HVRs específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de enlace completo.

“Fv de cadena única” que también se abrevia como “sFv” o “scFv”, son fragmentos de anticuerpos que comprenden a los dominios de anticuerpos VH y VL conectados dentro de una única cadena polipeptídica. Con preferencia, el polipéptido sFv comprende además un enlazador de polipéptidos entre los dominios VH y VL, el cual posibilita que sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.

Las “funciones efectoras” de los anticuerpos se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc variante de secuencia de aminoácidos o una región Fc de secuencia nativa) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo.

El término “región Fc” en la presente se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye regiones Fc variantes y regiones Fc de secuencia nativa. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define usualmente por estirarse a partir de un residuo de aminoácidos en la posición Cys226, o a partir de Pro230, hacia el término carboxilo de la misma. La lisina C-terminal (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede ser eliminada, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante la ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin residuos K447 eliminados, y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447. Las regiones Fc de secuencia nativa adecuadas para utilizar en los anticuerpos de la presente divulgación incluyen a las IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

Una “*región Fc de secuencia nativa*” comprende a una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos no A y A); una región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; una región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y una región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa así como también a las variantes de las mismas que se producen en forma natural.

Una “*región Fc variante*” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de aquélla de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, con preferencia una o más sustitución(es) de aminoácidos. Con preferencia, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, *por ejemplo* desde aproximadamente una hasta aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y con preferencia desde aproximadamente una hasta aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en la presente con preferencia poseerá al menos aproximadamente 80% de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 90% de homología con la misma, aún con más preferencia al menos aproximadamente 95% de homología con la misma.

“*Receptor Fc*” o “*FcR*” describe un receptor que se une con la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Más aún, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye a los receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII, y Fc γ RIII, incluyendo a

las variantes alélicas y alternativamente a las formas empalmadas de estos receptores, los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un “receptor de activación”) y Fc γ RIIB (un “receptor de inhibición”), que tienen similares secuencias de aminoácidos que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor de activación Fc γ RIIA contiene un motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (“ITAM”) en su dominio citoplasmático. El receptor de inhibición Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (“ITIM”) en su dominio citoplasmático. Otros FcRs, incluyendo a aquéllos a identificarse en el futuro, se encuentran comprendidos por el término “FcR” en la presente. Los FcRs también pueden aumentar la vida media en suero de los anticuerpos.

La unión a FcRn *in vivo* y la vida media en suero de polipéptidos con alta afinidad de unión a FcR humano puede ensayarse, *por ejemplo*, en ratones transgénicos o en líneas celulares humanas transfectadas que expresan al FcRn, o en primates a los cuales se les administra los polipéptidos que tienen una región Fc variante. WO 2004/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos con una mejorada o disminuida unión a FcRs. Véase también, *por ejemplo*, Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).

Como se usa en la presente, “*porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos*” y “*homología*” con respecto a una secuencia de péptidos, polipéptidos o anticuerpos se refiere al porcentaje de los residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia específica de péptidos o polipéptidos, luego de alinear las secuencias y de introducir brechas, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerando cualquiera de las sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencias. La alineación para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de las

secuencias de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que se encuentran dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software de computación públicamente conocido tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo a cualquiera de los algoritmos conocidos en la técnica necesarios para lograr la máxima alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando.

El término “*compite*” cuando se utiliza en el contexto de los anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos neutralizantes) que compiten por el mismo epítipo significa la competición entre anticuerpos según se determina mediante un ensayo en el cual el anticuerpo que se evalúa previene o inhibe (*por ejemplo*, reduce) la unión específica de una molécula de referencia (*por ejemplo*, un ligando, o un anticuerpo de referencia) a un antígeno común (*por ejemplo*, SIRPA o un fragmento del mismo). Pueden utilizarse numerosos tipos de ensayos de unión competitiva para determinar si un anticuerpo compete con otro, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competición tipo sándwich (véase, *por ejemplo*, Stahli et al., 1983, Métodos en Enzimología 9:242-253); EIA de biotina-avidina directa de fase sólida (véase, *por ejemplo*, Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137:3614-3619), ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo tipo sándwich marcado directo en fase sólida (véase, *por ejemplo*, Harlow y Lane, 1988, Anticuerpos, Un Manual de Laboratorio, Cold Spring Harbor Press); RIA marcado directo en fase sólida utilizando marca 1-125 (véase, *por ejemplo*, Morel et al., 1988, Immunol. Molec. 25:7-15); EIA de biotina-avidina directa de fase sólida (véase, *por ejemplo*, Cheung, et al., 1990, Virología 176:546-552); y RIA marcado directo (Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82). Típicamente, un ensayo como tal involucra la utilización de antígeno purificado

unido a una superficie sólida o a células que soportan cualquiera de éstos, un anticuerpo de ensayo no marcado y un anticuerpo de referencia marcado. La inhibición competitiva se mide mediante la determinación de la cantidad de marca unida a la superficie sólida o a las células en presencia del anticuerpo de ensayo. Usualmente el anticuerpo de ensayo se encuentra presente en exceso. Los anticuerpos identificados por medio de ensayo de competición (anticuerpos competitivos) incluyen a los anticuerpos que se unen al mismo epítipo como el anticuerpo de referencia y a los anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente lo suficientemente proximales al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que tenga lugar el impedimento estérico. En la presente se proporcionan detalles adicionales con respecto a los métodos para la determinación de la unión competitiva. Usualmente, cuando un anticuerpo competitivo se encuentra presente en exceso, éste inhibirá (*por ejemplo*, reducirá) la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, y/o cerca de 100%.

Como se usa en la presente, una “*interacción*” entre un polipéptido de SIRPA y un segundo polipéptido abarca, sin limitación, la interacción proteína-proteína, una interacción física, una interacción química, el enlace, el enlace covalente, y el enlace iónico. Como se usa en la presente, un anticuerpo “inhibe la interacción” entre dos polipéptidos cuando el anticuerpo interrumpe, reduce, o elimina por completo una interacción entre los dos polipéptidos. Un anticuerpo de la presente divulgación, a este respecto, “inhibe la interacción” entre dos polipéptidos cuando el anticuerpo de los mismos se une a uno de los dos polipéptidos. En algunas realizaciones, la interacción puede ser inhibida en al menos aproximadamente cualquiera de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, y/o cerca del 100%.

El término “*epítopo*” incluye cualquier determinante capaz de ser unida por un anticuerpo. Un epítopo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo que se dirige a ese antígeno, y cuando el antígeno es un polipéptido, incluye aminoácidos específicos que directamente se ponen en contacto con el anticuerpo. Con mayor frecuencia, los epítopos residen sobre los polipéptidos, pero en algunos casos, pueden residir sobre otras clases de moléculas, tales como los ácidos nucleicos. Los determinantes de epítopos pueden incluir agrupamientos de superficies químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, grupos fosforilo o sulfonilo, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Generalmente, los anticuerpos específicos para un antígeno blanco particular con preferencia reconocerán a un epítopo sobre el antígeno blanco en una mezcla compleja de polipéptidos y/o macromoléculas.

Un anticuerpo “*agonista*” o un anticuerpo “*activador*” es un anticuerpo que induce (por ejemplo, aumenta) una o más actividades o funciones del antígeno después de que el anticuerpo se une al antígeno.

Un anticuerpo “*antagonista*” o un anticuerpo “*bloqueador*” o un anticuerpo “*inhibidor*” es un anticuerpo que reduce, inhibe, y/o elimina (*por ejemplo*, disminuye) la unión del antígeno con un ligando o más después de que el anticuerpo se une al antígeno, y/o que reduce, inhibe, y/o elimina (*por ejemplo*, disminuye) una o más actividades o funciones del antígeno después de que el anticuerpo se une al antígeno. En algunas realizaciones, los anticuerpos antagonistas, o los anticuerpos bloqueadores, o los anticuerpos inhibidores inhiben sustancialmente o completamente la unión del antígeno con un ligando o más y/o una o más actividades o funciones del antígeno.

Un anticuerpo “*aislado*”, tal como un anticuerpo anti-SIRPA aislado de la presente divulgación, es uno que ha sido identificado, separado y/o recuperado a

partir de un componente de su entorno de producción (*por ejemplo*, en forma natural o recombinante). Con preferencia, el anticuerpo aislado se encuentra libre de asociación con todos los otros componentes contaminantes a partir de su entorno de producción. Los componentes contaminantes a partir de su entorno de producción, tales como aquéllos que resultan a partir de células transfectadas recombinantes, son materiales que típicamente interferirían con la investigación, el diagnóstico o los usos terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará: (1) hasta más que el 95% en peso del anticuerpo según se determina mediante, por ejemplo, el método de Lowry, y en algunas realizaciones, hasta más que el 99% en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencias de aminoácidos internas o N-terminales mediante la utilización de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad a través de SDS-PAGE bajo condiciones no reductores o reductoras utilizando azul de Coomassie o, con preferencia, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células T recombinantes puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no se encontrará presente. Por lo general, sin embargo, un polipéptido o anticuerpo aislado se preparará en al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico “*aislado*” que codifica un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, es una molécula de ácido nucleico que es identificada y separada a partir de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual ésta se encuentra por lo general asociada en el entorno en el cual ésta fue producida. Con preferencia, el ácido nucleico aislado se encuentra libre de asociación con todos los componentes asociados con el entorno de producción. Las moléculas de ácido nucleico aislado

que codifican a los polipéptidos y anticuerpos en la presente se encuentran en una forma aparte de la forma o disposición en la cual se encuentran en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aislado por lo tanto se distinguen del ácido nucleico que codifica a los polipéptidos y anticuerpos en la presente que existen de manera natural en las células.

El término “*vector*”, como se usa en la presente, está destinado a referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar a otro ácido nucleico con el cual ésta ha estado unida. Un tipo de vector es “un plásmido”, el cual se refiere a un ADN de doble cadena circular dentro del cual pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector de fagos. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde los segmentos de ADN adicionales pueden estar ligados dentro del genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped dentro de la cual ellos están introducidos (*por ejemplo*, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (*por ejemplo*, vectores no episomales de mamíferos) pueden estar integrados dentro del genoma de una célula huésped tras la introducción dentro de una célula huésped, y de este modo son replicados junto con el genoma huésped. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes hacia los cuales ellos se encuentran unidos de modo operativo. En la presente se hace referencia a dichos vectores como “vectores de expresión recombinante”, o simplemente, “vectores de expresión”. En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante se encuentran a menudo en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden utilizarse indistintamente dado que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada.

“Polinucleótido” o *“ácido nucleico,”* según se usa indistintamente en la presente, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluye al ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, bases o nucleótidos modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda ser incorporado dentro de un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o por medio de una reacción de síntesis.

Una *“célula huésped”* incluye un cultivo celular o célula individual que puede ser o que ha sido un receptor para el(los) vector(es) para la incorporación de insertos de polinucleótidos. Las células huésped incluyen a la progenie de una célula huésped única, y la progenie puede no necesariamente ser completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula parental original debido a la mutación natural, accidental, o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas in vivo con un polinucleótido(s) de esta invención.

“Portadores” como se usa en la presente incluyen a los portadores, excipientes, o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o mamífero que se expone a los mismos en las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de tampón pH. Los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones químicos tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como

sodio; y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, polietilen glicol (PEG), y PLURONICS™.

Como se usa en la presente, el término “*prevenir*” incluye proporcionar profilaxis con respecto a la ocurrencia o recurrencia de una enfermedad, trastorno, o afección en un individuo. Un individuo puede estar predispuesto a, susceptible a una enfermedad, trastorno, o afección particular, o en riesgo de desarrollar dicha enfermedad, trastorno, o afección, pero aún no ha sido diagnosticado con la enfermedad, trastorno, o afección.

Como se usa en la presente, un individuo “*en riesgo*” de desarrollar una enfermedad, trastorno, o afección particular puede o puede no tener una enfermedad o síntomas de una enfermedad detectables, y puede o puede no tener manifestados una enfermedad o síntomas de una enfermedad detectables previo a los métodos de tratamiento descritos en la presente. “En riesgo” denota que un individuo tiene uno o más factores de riesgo, los cuales constituyen parámetros medibles que se correlacionan con el desarrollo de una enfermedad, trastorno, o afección particular, según se conoce en la técnica. Un individuo que tiene uno o más de estos factores de riesgo tiene una más alta probabilidad de desarrollar una enfermedad, trastorno, o afección particular que un individuo sin uno o más de estos factores de riesgo.

Como se usa en la presente, el término “*tratamiento*” se refiere a la intervención clínica diseñada para alterar el curso natural del individuo que está siendo tratado durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la disminución de la tasa de progresión, el mejoramiento o mitigación del estado patológico, y la remisión o el mejorado pronóstico de una enfermedad, trastorno, o afección particular. Un individuo es “*tratado*” con éxito, por ejemplo, si uno o más de los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno, o afección particular son mitigados o eliminados.

Una “*cantidad efectiva*” se refiere a al menos una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad efectiva puede proporcionarse en una o más administraciones. Una cantidad efectiva en la presente puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo, y el peso del individuo, y la capacidad del tratamiento para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad efectiva también es una en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del tratamiento se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Para el uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retrasar el comienzo de la enfermedad, incluyendo a los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para el uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen a los resultados clínicos tales como la disminución de uno o más síntomas que resultan de la enfermedad, el incremento de la calidad de vida de aquéllos que sufren de la enfermedad, la disminución de las dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, el mejoramiento del efecto de otra medicación tal como a través de la focalización, el retraso de la progresión de la enfermedad, y/o la prolongación de la supervivencia. Una cantidad efectiva de fármaco, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para realizar el tratamiento profiláctico o terapéutico ya sea directamente o indirectamente. Según se comprende en el contexto clínico, una cantidad efectiva de un fármaco, compuesto, o composición farmacéutica puede o puede no alcanzarse en conjunción con otro fármaco, compuesto, o composición farmacéutica. De este modo, una “cantidad efectiva” puede considerarse en el contexto de la administración de uno o más agentes

terapéuticos, y un agente único puede considerarse como proporcionado en una cantidad efectiva si, en conjunción con uno o más de otros agentes, se logra o puede lograrse un resultado deseable.

Un “*individuo*” para los propósitos del tratamiento, prevención, o reducción del riesgo se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo a los humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deportes, o mascotas, tales como perros, caballos, conejos, ganado, cerdos, hámsters, jerbos, ratones, hurones, ratas, gatos, y similares. En algunas realizaciones, el individuo es humano.

Como se usa en la presente, la administración “*en conjunción*” con otro compuesto o composición incluye a la administración simultánea y/o a la administración en tiempos diferentes. La administración en conjunción también abarca a la administración como una coformulación o a la administración como composiciones separadas, incluyendo en diferentes frecuencias o intervalos de dosificación, y utilizando la misma ruta de administración o diferentes rutas de administración. En algunas realizaciones, la administración en conjunción es la administración como una parte del mismo régimen de tratamiento.

El término “*aproximadamente*” como se usa en la presente se refiere al rango de error usual para el respectivo valor fácilmente conocido para la persona experta en este campo técnico. La referencia a “*aproximadamente*” un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) realizaciones que están dirigidas a ese valor o parámetro *per se*.

Como se usa en la presente y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “una”, y “el/la” incluyen la referencia plural a menos que el contexto claramente lo indique de otra manera. Por ejemplo, la referencia a un “anticuerpo” es una referencia a desde uno a muchos anticuerpos, tales como

cantidades molares, e incluye a equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Se comprende que los aspectos y realizaciones de la presente divulgación descriptos en la presente incluyen a los aspectos y realizaciones “que comprenden”, “que constan de”, y “que constan esencialmente de”.

Anticuerpos anti-SIRPA

Regiones de enlace de anticuerpos anti-SIRPA

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación pueden unirse a un epítipo conformacional. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación pueden unirse a un epítipo de SIRPA discontinuo. En algunas realizaciones, el epítipo de SIRPA discontinuo comprende dos o más péptidos, tres o más péptidos, cuatro o más péptidos, cinco o más péptidos, seis o más péptidos, siete o más péptidos, ocho o más péptidos, nueve o más péptidos, o 10 o más péptidos. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación pueden unirse a un epítipo de SIRPA que comprende uno o más péptidos. Según se divulga en la presente, los epítipos de SIRPA pueden comprender uno o más péptidos que comprenden cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 o más residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 o más residuos de aminoácidos sobre una proteína de SIRPA de un mamífero que corresponde a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación se unen a un epítipo de SIRPA de humano que es el mismo o que se superpone con el epítipo de SIRPA unido por un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7, o un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación se unen esencialmente al mismo epítipo de SIRPA unido por un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la

secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7, o un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación inhiben competitivamente la unión de un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera

que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7, o un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación compiten con un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6, un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7, o un anticuerpo anti-SIRPA que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8 para la unión a SIRPA.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación inhiben competitivamente la unión de al menos un anticuerpo seleccionado de cualquiera de los anticuerpos enumerados en las **Tablas 4, 5, 7, 8 y 10**. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación inhiben competitivamente la unión de al menos un anticuerpo seleccionado de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación compite con uno o más anticuerpos seleccionados de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-

23, 3F9-24, 3F9-25, y cualquier combinación de los mismos, para la unión al SIRPA cuando el anticuerpo anti-SIRPA reduce la unión de uno o más anticuerpos seleccionados de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, y cualquier combinación de los mismos con SIRPA en una cantidad en los rangos desde aproximadamente 50% a 100%, en comparación con la unión al SIRPA en ausencia del anticuerpo anti-SIRPA. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación compite con uno o más anticuerpos seleccionados de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, y cualquier combinación de los mismos para la unión al SIRPA cuando el anticuerpo anti-SIRPA reduce la unión de uno o más anticuerpos seleccionados de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, y cualquier combinación de los mismos con SIRPA en al menos 50%, al menos 55%, en al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o 100%, en comparación con la unión al SIRPA en ausencia del anticuerpo anti-SIRPA. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación que reduce la unión de uno o más anticuerpos seleccionados de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1

(14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, y cualquier combinación de los mismos con SIRPA en un 100% indica que el anticuerpo anti-SIRPA esencialmente bloquea por completo la unión de uno o más anticuerpos seleccionados de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, y cualquier combinación de los mismos con SIRPA. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA y el uno o más anticuerpos seleccionados de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, y cualquier combinación de los mismos se encuentran presentes en una cantidad que corresponde a una relación 10:1, relación 9:1, relación 8:1, relación 7:1, relación 6:1, relación 5:1, relación 4:1, relación 3:1, relación 2:1, relación 1:1, relación 0,75:1, relación 0,5:1, relación 0,25:1, relación 0,1:1, relación 0,075:1, relación 0,050:1, relación 0,025:1, relación 0,01:1, relación 0,0075: , relación 0,0050:1, relación 0,0025:1, relación 0,001: , relación 0,00075:1, relación 0,00050:1, relación 0,00025:1, relación 0,0001: , relación 1:10, relación 1:9, relación 1:8, relación 1:7, relación 1:6, relación 1:5, relación 1:4, relación 1:3, relación 1:2, relación 1:0,75, relación 1:0,5, relación 1:0,25, relación 1:0,1, relación 1:0,075, relación 1:0,050, relación 1:0,025, relación 1:0,01, relación 1:0,0075, relación 1:0,0050, relación 1:0,0025, relación 1:0,001, relación 1:0,00075, relación 1:0,00050, relación 1:0,00025, o relación 1:0,0001 del

anticuerpo anti-SIRPA con uno o más anticuerpos seleccionados de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA se encuentra presente en exceso en una cantidad que tiene un rango desde aproximadamente 1,5 veces a 100 veces, o mayor a 100 veces en comparación con la cantidad del uno o más anticuerpos seleccionados de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA se encuentra presente en una cantidad que es de aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 55 veces, 60 veces, 65 veces, 70 veces, 75 veces, 80 veces, 85 veces, 90 veces, 95 veces, o 100 veces en exceso en comparación con la cantidad del uno o más anticuerpos seleccionados de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación se unen a un epítipo de SIRPA de humano que es el mismo o que se superpone con epítipo de SIRPA unido en al menos un anticuerpo seleccionado

de cualquiera de los anticuerpos enumerados en las **Tablas 4, 5, 7, 8, y 10**. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación se unen a un epítipo de SIRPA de humano que es el mismo o que se superpone con el epítipo de SIRPA unido en al menos un anticuerpo seleccionado de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación se unen esencialmente al mismo epítipo de SIRPA unido en al menos un anticuerpo seleccionado de cualquiera de los anticuerpos enumerados en las **Tablas 4, 5, 7, 8, y 10**. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación se unen esencialmente al mismo epítipo de SIRPA unido en al menos un anticuerpo seleccionado de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25. Se proporcionan métodos ejemplificativos detallados para el mapeo de un epítipo al cual se une un anticuerpo en Morris (1996) "Protocolos del Mapeo de Epítopos", en *Métodos en Biología Molecular* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación compiten con uno o más anticuerpos seleccionados de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18,

3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, y cualquier combinación de los mismos para la unión a SIRPA.

Puede utilizarse cualquier ensayo de competición o ensayo de unión a SIRPA conocidos en la técnica adecuados, tales como el análisis BIAcore, los ensayos ELISA, o la citometría de flujo, para determinar si un anticuerpo anti-SIRPA compete con uno o más anticuerpos seleccionados de m3F9, h3F9 H1/L1 (14.70.1), h3F9 H1/L2 (14.70.2), h3F9 H1/L3, h3F9 H2/L1 (14.70.4), h3F9 H2/L2, h3F9 H2/L3, 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, 3F9-25, y cualquier combinación de los mismos para la unión al SIRPA. En un ensayo de competición ejemplificativo, se incuban células que expresan SIRPA sobre la superficie celular o SIRPA inmovilizados en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al SIRPA (*por ejemplo*, de un primate humano o no humano) y un segundo anticuerpo marcado que se evalúa en cuanto a su capacidad de competir con el primer anticuerpo para la unión al SIRPA. El segundo anticuerpo puede encontrarse presente en un sobrenadante de hibridomas. Como un control, SIRPA o células que expresan SIRPA inmovilizados se incuban en una solución que comprende al primer anticuerpo marcado pero no al segundo anticuerpo marcado. Luego de la incubación bajo condiciones que permiten la unión del primer anticuerpo a SIRPA, se retira el anticuerpo no unido en exceso, y se mide la cantidad de marca asociada con SIRPA o células que expresan SIRPA inmovilizados. Si la cantidad de marca asociada con SIRPA o células que expresan SIRPA inmovilizados se encuentra sustancialmente reducida en la muestra de ensayo en relación con la muestra de control, entonces ello indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo para la unión al

SIRPA. Véase, Harlow y Lane (1988) *Anticuerpos: Un Manual de Laboratorio* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

En algunas realizaciones, en la presente se proporcionan anticuerpos anti-SIRPA que comprenden al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis HVRs seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:22, 23, y 24; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, y 19.

En algunas realizaciones, en la presente se proporcionan anticuerpos anti-SIRPA que comprenden al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis HVRs seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:11; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:12; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que

comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:13; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:14; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:15; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:16; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que

comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:17; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:18; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:19; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:11; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:13; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que

comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:14; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:15; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:16; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:17; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que

comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:16; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:17; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:18; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:23; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:19; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:11; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que

comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:13; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:14; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:15; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:16; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que

comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:17; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:18; y (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:24; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:19.

En algunas realizaciones, en la presente se proporcionan anticuerpos anti-SIRPA que comprenden al menos una, al menos dos, o todas de las tres secuencias HVR de VH seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21; y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:22, 23, y 24.

En algunas realizaciones, en la presente se proporcionan anticuerpos anti-SIRPA que comprenden al menos una, al menos dos, o todas de las tres secuencias HVR de VL seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10; y (c) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, y 19.

En algunas realizaciones, en la presente se proporcionan anticuerpos anti-SIRPA que comprenden (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o todas de las tres secuencias HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:22, 23, y 24, y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o todas de las tres secuencias HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10, y (c) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, y 19.

En algunas realizaciones, en la presente se proporcionan anticuerpos anti-SIRPA que comprenden (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:22, 23, y 24, y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10, y (c) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de seleccionada de SEQ ID NOs:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, y 19.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-SIRPA comprende una secuencia de dominio variable (VH) de cadena pesada que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos elegida de SEQ ID NOs:33, 34, y 35. En ciertas realizaciones, una secuencia de VH que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con una secuencia de

aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:33, 34, y 35 contiene sustituciones (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-SIRPA que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a SIRPA. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o suprimidos en SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, o SEQ ID NO:35. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 5 aminoácidos han sido sustituidos, insertados y/o suprimidos en SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO:34, o SEQ ID NO:35. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren en regiones fuera de las HVRs HVRs (*es decir*, en las FRs). Opcionalmente, el anticuerpo anti-SIRPA comprende a la secuencia de VH de la SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, o SEQ ID NO:35, incluyendo a las modificaciones post-traduccionales de esa secuencia. En una realización particular, el VH comprende una, dos o tres HVRs seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21, y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:22, 23, y 24.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-SIRPA, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable (VL) de cadena ligera que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, y 44. En ciertas realizaciones, una secuencia de VL que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, y 44 contiene sustituciones (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras), inserciones, o supresiones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-SIRPA que comprende esa

secuencia conserva la capacidad de unirse a SIRPA. En algunas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados y/o suprimidos en SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, o SEQ ID NO:44. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 5 aminoácidos han sido sustituidos, insertados y/o suprimidos en SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, o SEQ ID NO:44. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o supresiones ocurren en regiones fuera de las HVRs HVRs (*es decir*, en las FRs). Opcionalmente, el anticuerpo anti-SIRPA comprende la secuencia de VL de las SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, o SEQ ID NO:44, incluyendo las modificaciones post-traduccionales de esa secuencia. En una realización particular, el VL comprende una, dos o tres HVRs seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10, y (c) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, y 19.

En algunas realizaciones, se proporciona el anticuerpo anti-SIRPA, en donde el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente. En algunas realizaciones, en la presente se proporcionan anticuerpos anti-SIRPA, en donde el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en SEQ ID NOs:33, 34, o 35 y SEQ ID NOs:36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, o 44,

respectivamente, incluyendo las modificaciones post-traduccionales de esas secuencias.

En algunas realizaciones, en la presente se proporcionan anticuerpos anti-SIRPA que comprenden un dominio variable (VH) de cadena pesada y un dominio variable (VL) de cadena ligera, en donde VH y VL están seleccionados del grupo integrado por: VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:33 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:36; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:33 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:37; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:33 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:38; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:33 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:39; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:33 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:40; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:33 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:41; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:33 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:42; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:33 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:43; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:33 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:44; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:34 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:36; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:34 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:38; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:34 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:39; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:34 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:40; VH que

comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:34 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:41; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:34 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:42; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:34 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:43; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:34 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:44; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:35 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:36; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:35 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:38; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:35 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:39; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:35 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:40; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:35 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:41; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:35 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:42; VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:35 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:43; y VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:35 y VL que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:44.

En la presente se proporcionan además anticuerpos anti-SIRPA que inhiben competitivamente la unión de y/o compiten por la unión con un anticuerpo anti-SIRPA que comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:22, 23, y 24, y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia

de aminoácidos SEQ ID NO:9, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10, y (c) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de seleccionada de SEQ ID NOs:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, y 19. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en SEQ ID NOs:33, 34, o 35, y SEQ ID NOs:36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, o 44, respectivamente.

En la presente se proporcionan anticuerpos anti-SIRPA que se unen a un epítipo de SIRPA de humano que es el mismo o que se superpone con el epítipo unido por un anticuerpo anti-SIRPA que comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:21, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:22, 23, y 24, y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10, y (c) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, y 19. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en SEQ ID NOs:33, 34, o 35, y SEQ ID NOs:36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, y 44, respectivamente. En algunas realizaciones, el epítipo de SIRPA de humano es el mismo epítipo que el unido por un anticuerpo anti-SIRPA.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo humanizado y/o humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA es un fragmento de anticuerpo, *por ejemplo*, un fragmento de Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo, o F(ab')₂. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA es un anticuerpo sustancialmente de longitud completa, *por*

ejemplo, un anticuerpo de IgG1, un anticuerpo de IgG2a u otra clase o isotipo de anticuerpo según se define en la presente.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, según se describe en la presente.

En la presente se proporcionan anticuerpos anti-SIRPA. Los anticuerpos proporcionados son útiles, *por ejemplo*, para el diagnóstico o el tratamiento de trastornos mediados por SIRPA.

La presente divulgación se relaciona, en parte, con anticuerpos anti-SIRPA que presentan una o más características funcionales perfeccionadas y/o mejoradas (*por ejemplo*, en relación con un anticuerpo anti-SIRPA que tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5), incluyendo, por ejemplo, a los anticuerpos anti-SIRPA capaces de disminuir los niveles celulares de SIRPA, a los anticuerpos anti-SIRPA capaces de disminuir los niveles de superficie celular de SIRPA, a los anticuerpos anti-SIRPA capaces de degradar SIRPA, a los anticuerpos anti-SIRPA capaces de disminuir los niveles celulares de CD32A/B, a los anticuerpos anti-SIRPA capaces de aumentar o mejorar la fagocitosis, a los anticuerpos anti-SIRPA capaces de aumentar o mejorar la fagocitosis de las células tumorales por los macrófagos, a los anticuerpos anti-SIRPA capaces de aumentar o mejorar la actividad antitumoral de las terapias anticáncer, a los anticuerpos anti-SIRPA capaces de aumentar o mejorar la proliferación de células T, a los anticuerpos anti-SIRPA capaces de aumentar o mejorar la liberación de citoquinas proinflamatorias desde los macrófagos, y/o a los anticuerpos anti-SIRPA capaces de unirse a SIRPA de humano con cinética aumentada/mejorada; con métodos de

elaboración y utilización de dichos anticuerpos anti-SIRPA; con composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos anti-SIRPA; con ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos anti-SIRPA; y con células huésped que contienen ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos anti-SIRPA.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación pueden tener una o más actividades que se deben, al menos en parte, a la capacidad de los anticuerpos para reducir la expresión celular (*por ejemplo*, la expresión de la superficie celular) de SIRPA induciendo la degradación, la regulación hacia abajo, la escisión, la desensibilización del receptor, y/o la focalización lisosómica de SIRPA. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación que disminuye los niveles celulares de SIRPA es un anticuerpo que presenta una o más de las siguientes características: (1) inhibe o reduce una o más actividades de SIRPA; (2) la capacidad para reducir la expresión de SIRPA (tal como en el nivel de mRNA y/o en el nivel de proteínas) en células que expresan SIRPA; (3) la capacidad para interactuar, unirse, o reconocer una proteína de SIRPA; (4) la capacidad para interactuar específicamente con o de unirse a una proteína de SIRPA; y (5) la capacidad para tratar, mejorar, o prevenir cualquier aspecto de una enfermedad o trastorno descrito en la presente.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA presentan una o más de las siguientes propiedades: a) tienen una constante de disociación (KD) para SIRPA de humano que es inferior que la de aquella de un anticuerpo anti-SIRPA que tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5; b) se unen a células humanas, tales como monocitos y macrófagos humanos; c) disminuyen los niveles de superficie celular de SIRPA (*por ejemplo*, disminuyen los niveles de superficie celular de

SIRPA en las células macrófagos humanas *in vitro* con una concentración efectiva media-máxima (EC50) que es inferior que la de aquélla de un anticuerpo anti-SIRPA que tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5; d) tienen una constante de disociación (KD) para SIRPA de humano que puede tener un rango desde aproximadamente 0,6 nM hasta aproximadamente 0,7 nM; y/o e) disminuye los niveles de la superficie celular de SIRPA (*por ejemplo*, disminuye los niveles de la superficie celular de SIRPA en macrófagos humanos *in vitro* con una concentración efectiva media-máxima (EC50) que puede tener un rango desde aproximadamente 0,4 nM hasta aproximadamente 0,5 nM. Según se divulga en la presente la concentración efectiva media-máxima (EC50) se refiere a la concentración en la cual un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación reduce los niveles celulares de SIRPA sobre una célula o dentro de una célula hasta la mitad de aquélla de las células no tratadas, o la concentración en la cual el anticuerpo logra la mitad de la unión máxima a SIRPA sobre una célula.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo reduce los niveles de la superficie celular de SIRPA *in vitro* con una concentración efectiva media máxima (EC50) para SIRPA v1 de humano de aproximadamente 0,40 nM aproximadamente 0,5 nM según se mide a través de citometría de flujo. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo reduce los niveles de la superficie celular de SIRPA *in vitro* con una concentración efectiva media máxima (EC50) para SIRPA v1 de humano de aproximadamente 5 nM, de

aproximadamente 4 nM, de aproximadamente 3 nM, de aproximadamente 2 nM, de aproximadamente 1 nM, de aproximadamente 0,9 nM, de aproximadamente 0,8 nM, de aproximadamente 0,7 nM, de aproximadamente 0,6 nM, de aproximadamente 0,5 nM, de aproximadamente 0,4 nM, de aproximadamente 0,3 nM, de aproximadamente 0,2 nM, o de aproximadamente 0,1 nM según se mide a través de citometría de flujo. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo reduce los niveles de la superficie celular de SIRPA *in vitro* con una concentración efectiva media máxima (EC50) para SIRPA v1 de humano en el rango de aproximadamente 5 nM a 1 nM, de aproximadamente 1 nM a 0,9 nM, de aproximadamente 1 nM a 0,8 nM, de aproximadamente 1 nM a 0,7 nM, de aproximadamente 1 nM a 0,6 nM, de aproximadamente 1 nM a 0,5 nM, de aproximadamente 1 nM a 0,4 nM, de aproximadamente 1 nM a 0,3 nM, de aproximadamente 1 nM a 0,2 nM, de aproximadamente 1 nM a 0,1 nM, de aproximadamente 0,9 nM a 0,8 nM, de aproximadamente 0,9 nM a 0,7 nM, de aproximadamente 0,9 nM a 0,6 nM, de aproximadamente 0,9 nM a 0,5 nM, de aproximadamente 0,9 nM a 0,4 nM, de aproximadamente 0,9 nM a 0,3 nM, de aproximadamente 0,9 nM a 0,2 nM, de aproximadamente 0,9 nM a 0,1 nM, de aproximadamente 0,8 nM a 0,6 nM, de aproximadamente 0,8 nM a 0,5 nM, de aproximadamente 0,8 nM a 0,4 nM, de aproximadamente 0,8 nM a 0,3 nM, de aproximadamente 0,8 nM a 0,2 nM, de aproximadamente 0,8 nM a 0,1 nM, de aproximadamente 0,7 nM a 0,5 nM, de aproximadamente 0,7 nM a 0,4 nM, de aproximadamente 0,7 nM a 0,3 nM, de aproximadamente 0,7 nM a 0,2 nM, de aproximadamente 0,7 nM a 0,1 nM, de aproximadamente 0,6 nM a 0,4 nM, de aproximadamente 0,6 nM a 0,3 nM, de aproximadamente 0,6 nM a 0,2 nM, de aproximadamente 0,6 nM a 0,1 nM, de aproximadamente 0,5 nM a 0,3 nM, de

aproximadamente 0,5 nM a 0,2 nM, de aproximadamente 0,5 nM a 0,1 nM, de aproximadamente 0,4 nM a 0,2 nM, de aproximadamente 0,4 nM a 0,1 nM, o de aproximadamente 0,3 nM a 0,1 nM según se mide a través de citometría de flujo.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo reduce los niveles de la superficie celular de SIRPA *in vitro* con una concentración efectiva media máxima (EC50) para SIRPA v1 de humano de aproximadamente 0,093 nM, para SIRPA v2 de humano de aproximadamente 0,080 nM, y/o para cyno SIRPA de aproximadamente 0,879 nM según se mide a través de citometría de flujo. En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo reduce los niveles de la superficie celular de SIRPA *in vitro* con una concentración efectiva media máxima (EC50) para SIRPA v1 de humano o para SIRPA v2 de humano en el rango de aproximadamente 2 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 1 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,9 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,8 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,7 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,6 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,5 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,4 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,3 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,20 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,15 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,10 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,09 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,08 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,07 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,06 nM a 0,05 nM, de aproximadamente 0,20 nM a 0,06 nM, de aproximadamente 0,15 nM a 0,06 nM, de aproximadamente 0,10 nM a 0,06 nM, de aproximadamente 0,09 nM a 0,06 nM, de aproximadamente 0,08 nM hasta aproximadamente 0,06 nM, de aproximadamente 0,07 nM a 0,06 nM, de

aproximadamente 0,20 nM a 0,07 nM, de aproximadamente 0,15 nM a 0,07 nM, de aproximadamente 0,10 nM hasta aproximadamente 0,07 nM, de aproximadamente 0,09 nM a 0,07 nM, de aproximadamente 0,08 nM a 0,7nM, de aproximadamente 0,20 nM a 0,08 nM, de aproximadamente 0,15 nM a 0,08 nM, de aproximadamente 0,10 nM a 0,08 nM, de aproximadamente 0,09 nM a 0,08 nM, de aproximadamente 0,20 nM a 0,09 nM, de aproximadamente 0,15 nM a 0,09 nM, o de aproximadamente 0,10 nM a 0,9 nM según se mide a través de citometría de flujo.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones en la presente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a SIRPA de humano, en donde el anticuerpo reduce los niveles de la superficie celular de SIRPA *in vitro* con una concentración efectiva media máxima (EC50) para SIRPA v1 de humano de aproximadamente 0,107 nM, para SIRPA v2 de humano de aproximadamente 0,082 nM, y/o para cyno SIRPA de aproximadamente 0,107 nM según se mide a través de citometría de flujo.

De modo ventajoso, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación reducen la expresión de la superficie celular de SIRPA de modo más potente (*por ejemplo*, con una CE50 más baja) en comparación con un anticuerpo anti-SIRPA de control (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-SIRPA de control que tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5). Más aún, de modo ventajoso, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación tienen una afinidad más alta (*por ejemplo*, una afinidad hasta aproximadamente 100 veces más alta) con SIRPA (*por ejemplo*, un valor de KD más bajo según se mide por medio de resonancia de plasmones superficiales) en comparación con un anticuerpo anti-SIRPA de control (*por*

ejemplo, un anticuerpo anti-SIRPA de control que tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se basan, al menos en parte, en la identificación de anticuerpos anti-SIRPA que presentan una o más características funcionales perfeccionadas y/o mejoradas (por ejemplo, en relación con un anticuerpo anti-SIRPA que tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5), que incluyen, una capacidad perfeccionada/mejorada para disminuir los niveles de superficie celular de SIRPA sobre las células, resultando en la reducción, neutralización, prevención, o detención de una o más actividades de SIRPA, incluyendo, sin limitación, la reducción del crecimiento celular de monocitos, macrófagos, células T, células dendríticas y/o microglía; la reducción de la proliferación de células T inducida por las células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, monocitos, microglía, microglía de M1, microglía de M1 activada, microglía de M2, macrófagos, macrófagos M1, macrófagos M1 y/o macrófagos M2 activados; la disminución de la supervivencia de neutrófilos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, macrófagos, macrófagos M1, macrófagos M1 activados, macrófagos M2, monocitos, osteoclastos, células T, células T auxiliares, células T citotóxicas, granulocitos, microglía, microglía de M1, microglía de M1, y/o microglía de M2 activada; la disminución de la proliferación de neutrófilos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, macrófagos, macrófagos M1, macrófagos M1 activados, macrófagos M2, monocitos, osteoclastos, células T, células T auxiliares, células T citotóxicas, granulocitos, microglía, microglía de M1,

microglía de M1, y/o microglía de M2 activada; la inhibición de la migración de neutrófilos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, macrófagos, macrófagos M1, macrófagos M1 activados, macrófagos M2, monocitos, osteoclastos, células T, células T auxiliares, células T citotóxicas, granulocitos, microglía, microglía de M1, microglía de M1, y/o microglía de M2 activada; la disminución de una o más funciones de los neutrófilos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, macrófagos, macrófagos M1, macrófagos M1 activados, macrófagos M2, monocitos, osteoclastos, células T, células T auxiliares, células T citotóxicas, granulocitos, microglía, microglía de M1, microglía de M1, y/o microglía de M2 activada; la reducción de la proliferación de monocitos, macrófagos, células T, células dendríticas, neutrófilos, y/o microglía; la reducción de la funcionalidad total de los monocitos, macrófagos, células T, células dendríticas, neutrófilos, y/o microglía; la inhibición de la beneficiosa respuesta inmune a diferentes tipos de cáncer seleccionados de cáncer de vejiga, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, linfoma de no Hodgkin, leucemia mieloide aguda, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, fibrosarcoma, y cáncer de tiroides; la inhibición de la beneficiosa respuesta inmune a diferentes tipos de trastornos neurológicos seleccionados de demencia, demencia frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia mixta, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hidrocefalia de presión normal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de tauopatía, enfermedad de Nasu-Hakola, accidente cerebrovascular, trauma agudo, trauma crónico, temblor esencial, enfermedad de Behcet, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples, síndrome de Shy-Drager, parálisis supranuclear progresiva,

degeneración gangliónica basal cortical, encefalomiелitis aguda diseminada, trastornos granulomatosos, Sarcoidosis, enfermedades del envejecimiento, convulsiones, lesión de la médula espinal, lesión cerebral traumática, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, retinitis pigmentosa, degeneración de la retina, y esclerosis múltiple; la unión a ligando de SIRPA sobre las células tumorales; la unión a ligando de SIRPA sobre las células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, monocitos, microglía, células T, neutrófilos, y/o macrófagos; la inhibición de las células tumorales mediante el exterminio de uno o más de microglía, macrófagos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, neutrófilos, células T, células T auxiliares, o células T citotóxicas; la inhibición de la actividad de proliferación de células antitumorales de uno o más de microglía, macrófagos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, neutrófilos, células T, células T auxiliares, o células T citotóxicas; la inhibición de la actividad de metástasis de las células antitumorales de uno o más de microglía, macrófagos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, neutrófilos, células T, células T auxiliares, o células T citotóxicas; la expresión modulada de uno o más receptores inflamatorios, tales como CD86, expresados en uno o más de microglía, macrófagos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, neutrófilos, células T, células T auxiliares, o células T citotóxicas; el mejoramiento de la infiltración de uno o más de células dendríticas inmunosupresoras, macrófagos inmunosupresores, células supresoras derivadas de mieloides, macrófagos asociados a tumores, neutrófilos inmunosupresores, y células T reguladoras dentro de tumores; el incremento de la cantidad de células inmunosupresoras mieloides/granulocíticas que promueven los tumores en un tumor, en sangre periférica, u otro órgano linfoide; el mejoramiento de la actividad promotora de tumores de las células supresoras

derivadas de mieloides; la disminución de la activación de linfocitos T específicos de tumores con potencial de exterminio de tumores; la disminución de la infiltración de linfocitos T específicos de tumores con potencial de exterminio de tumores; el aumento de la tasa de crecimiento tumoral; el aumento de la tasa de recurrencia del tumor; la disminución de la eficacia de una o más terapias inmunes que modulan las respuestas de las células T antitumorales, opcionalmente en donde la una o más terapias inmunes son terapias inmunes que se focalizan en una o más proteínas seleccionadas de CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD39, CD70, TREM1, TREM2, Siglec-5, Siglec-7, Siglec-9, Siglec-11, SirpA, CD447, receptor del CSF-1, y cualquier combinación de los mismos, o de uno o agentes quimioterapéuticos y/o más vacunas para el cáncer.

En algunas realizaciones, el tratamiento del cáncer con anticuerpos anti-SIRPA según se describe en la presente puede: (i) aumentar la cantidad de células T CD3+ infiltrantes de tumores; (ii) disminuir los niveles celulares de SIRPA en células mieloides CD14+ no tumorigénicas, opcionalmente en donde las células mieloides CD14+ no tumorigénicas son células infiltrantes de tumores u opcionalmente en donde las células mieloides CD14+ no tumorigénicas se encuentran presentes en la sangre; (iii) reducir la cantidad de células mieloides CD14+ no tumorigénicas, opcionalmente en donde las células mieloides CD14+ no tumorigénicas son células infiltrantes de tumores u opcionalmente en donde las células mieloides CD14+ no tumorigénicas se encuentran presentes en la sangre; (iv) d reducir los niveles de PD-L1, PD-L2, B7-H7, B7-H3, CD200R, CD163, y/o CD206 en una o más células, opcionalmente en donde la una o más células son células supresoras derivadas de mieloides no tumorigénicas (MDSC); (v) disminuir la tasa de crecimiento tumoral de los tumores sólidos; (vi) reducir el

volumen del tumor; (vii) aumentar la eficacia de uno o más inhibidores de PD-1; (viii) aumentar la eficacia de una o más terapias con inhibidores de punto de control y/o de las terapias inmunomoduladoras, opcionalmente en donde la una o más terapias con inhibidores de punto de control y/o de las terapias inmunomoduladoras se focalizan en uno o más de CTL4, la vía de la adenosina, PD-L1, PD-L2, OX40, TIM3, LAG3, o cualquier combinación de los mismos; (ix) aumentar la eficacia de uno o más agentes quimioterapéuticos, opcionalmente en donde el uno o más agentes quimioterapéuticos son gemcitabina, capecitabina, antraciclinas, doxorubicina (Adriamycin®), epirubicina (Ellence®), taxanos, paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), 5-fluorouracilo (5-FU), ciclofosfamida (Cytosan®), carboplatino (Paraplatin®), y cualquier combinación de los mismos; (x) aumentar la proliferación de células T en presencia de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) no tumorigénicas; (xi) inhibir la diferenciación, supervivencia, y/o una o más funciones de las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) no tumorigénicas; y (xii) exterminar a las células mieloides no tumorigénicas inmunosupresoras que expresan CD33 y/o a las células que expresan CD14 no tumorigénicas en los tumores sólidos y a los vasos sanguíneos relacionados cuando se conjugan con una toxina química o radioactiva.

En algunas realizaciones, las células mieloides de la presente divulgación incluyen, sin limitación, a las células mieloides CD45+CD14+, células mieloides CD14+, y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC). En algunas realizaciones, las células mieloides de la presente divulgación son células mieloides no tumorigénicas. A veces se hace referencia a las células inmunosupresoras como células supresoras derivadas de mieloides (MDSC). En los humanos, las MDSCs pueden definirse por una de la siguiente combinación de marcadores: (1) CD14+ HLA-DR^{low}/-, (2) CD14+ IL4R α +, (3) CD14+ HLA-DR-IL4R α +, (4) CD34+ CD14+ CD11b+ CD33+, (5) CD11b+ CD14+ CD33+, (6)

CD33+ HLA-DR-, (7) Lin- HLA-DR-, (8) Lin- HLA-DR- CD33+, (9) Lin- HLA-DR- CD33+ CD11b+, (10) Lin- CD33+ CD11b+ CD15+, (11) Lin- HLA-DR- CD33+ CD11b+ CD14- CD15+, (12) CD11b+ CD14- CD33+, (13) CD11b+ CD14- HLA-DR- CD33+ CD15+, (14) CD33+ HLA-DR- CD15+, (15) CD15+ IL4R α +, (16) CD11b+ CD15+ CD66b+, (17) CD15+ FSCbajo SSCalto, (18) CD15alto CD33+, (19) CD11b+ CD14- CD15+, (20) CD66b+ SSCalto, y (21) CD11b+ CD15+ (véase también Solito S et al. Anales de la Academia de Ciencias de Nueva York, 2014). En los ratones, las MDSCs pueden definirse por medio de la expresión de los marcadores de superficie CD45+, CD11b+, Gr1+, y/o IL4Ra+. Los linajes monocíticos inmunosupresores ejemplificativos adicionales son CD45+, CD11b+, Gr1bajo; y CD45+, CD11c+.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación disminuye los niveles de la superficie celular de SIRPA, disminuye los niveles intracelulares de SIRPA, disminuye los niveles celulares totales de SIRPA, o cualquier combinación de los mismos, solamente en presencia de compañeros de enlace o ligandos naturales de SIRPA.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación previene, reduce, o inhibe la actividad mediada por SIRPA de un compañero de enlace o ligando de SIRPA, que incluye por ejemplo, el compañero de enlace o ligando de SIRPA CD47, proteína surfactante A, y/o proteína surfactante D.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une selectivamente a SIRPA de humano, incluyendo variantes alélicas humanas, también veneradas en la presente como variantes "polimórficas", que incluyen SIRPA v1 de humano y SIRPA v2 de humano, se une a SIRP β 3 humano, se une a cyno SIRPA, y se une a SIRPA de mono tití. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación no se

une a SIRPA de ratón/murino, no se une a SIRPB v1 (SIRPβ1), no se une a SIRPA de conejo, y no se une a SIRPA de rata.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une selectivamente a SIRPA de humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une selectivamente a SIRPA de humano y a cyno SIRPA. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une a SIRPA v1 de humano, SIRPA v2 de humano, y cyno SIRPA. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une a SIRPA v1 de humano, SIRPA v2 de humano, y cyno SIRPA, pero no se une a SIRPA murino. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une a SIRPA v1 de humano, SIRPA v2 de humano, y cyno SIRPA, pero no se une a SIRPβ1. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une a SIRPA v1 de humano, SIRPA v2 de humano, y cyno SIRPA, pero no se une a SIRPA murino y no se une a SIRPβ1 humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une a SIRPA v1 de humano, SIRPA v2 de humano, cyno SIRPA, y SIRPA de humanoβ3, pero no se une a SIRPA murino y no se une a SIRPβ1 humano. En cualquier combinación de las realizaciones anteriores, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente invención no bloquea la unión o interacción de SIRPA y CD47.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se relacionan con anticuerpos anti-SIRPA que regulan hacia abajo, *es decir*, disminuyen los niveles celulares de SIRPA. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA disminuye los niveles celulares de SIRPA sin inhibir, bloquear, o reducir la interacción (*por ejemplo*, uniendo) entre SIRPA y uno o más ligandos de SIRPA, *por ejemplo*, CD47.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación pueden tener una o más actividades que se deben, al menos en parte,

a la capacidad de los anticuerpos para reducir los niveles celulares (*por ejemplo*, la expresión de la superficie celular) de SIRPA al inducir la degradación, la regulación hacia abajo, la escisión, la desensibilización del receptor, y/o la focalización lisosómica de SIRPA.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación regula hacia abajo la expresión de SIRPA en las células. En algunas realizaciones, la regulación hacia abajo de la expresión de SIRPA en las células es la expresión de la superficie celular de SIRPA reducida. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación regula hacia abajo la expresión de SIRPA en los monocitos (*por ejemplo*, monocitos humanos). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación regula hacia abajo la expresión de SIRPA en los macrófagos (*por ejemplo*, macrófagos humanos). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente invención regula hacia abajo la expresión de la superficie celular de macrófagos de SIRPA en más del 70%, en más del 75%, en más del 80%, en más del 85%, or en más del 95% en comparación con el nivel de expresión de la superficie celular de SIRPA en los macrófagos no tratados con un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación regula hacia abajo la expresión de la superficie celular de macrófagos de SIRPA en aproximadamente 70-90%, en aproximadamente 70-85%, en aproximadamente 70-80%, pero aproximadamente 70-75%, en aproximadamente 75-90%, en aproximadamente 75-85%, en aproximadamente 75-80% en aproximadamente 80-90%, en aproximadamente 80-85%, o en aproximadamente 85-95% en comparación con el nivel de expresión de la superficie celular de SIRPA en los macrófagos no tratados con un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación. En algunas realizaciones, los

macrófagos son macrófagos humanos, incluyendo pero no limitados a macrófagos humanos M1 y macrófagos humanos M2.

Los niveles celulares de SIRPA pueden referirse a, sin limitación, los niveles de superficie celular de SIRPA, los niveles intracelulares de SIRPA, y los niveles totales de SIRPA. En algunas realizaciones, una disminución en los niveles celulares de SIRPA comprende una disminución en los niveles de superficie celular de SIRPA. Como se usa en la presente, un anticuerpo anti-SIRPA disminuye los niveles de la superficie celular de SIRPA si éste induce una disminución del 25% o más en los niveles de superficie celular de SIRPA según se mide por medio de cualquier ensayo basado en células *in vitro* o modelo *in vivo* adecuado descrito en la presente o conocido en la técnica, por ejemplo la utilización de citometría de flujo, tal como clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), para medir los niveles de superficie celular de SIRPA. En algunas realizaciones, una disminución en los niveles celulares de SIRPA comprende una disminución en los niveles intracelulares de SIRPA. Como se usa en la presente, un anticuerpo anti-SIRPA disminuye los niveles intracelulares de Siglec-9 si éste induce una disminución del 25% o más en los niveles intracelulares de SIRPA según se mide por medio de cualquier ensayo basado en células *in vitro* o modelo *in vivo* adecuado descrito en la presente o conocido en la técnica, *por ejemplo* inmunotinción, análisis de Western blot, coimmunoprecipitación, y citometría celular. En algunas realizaciones, una disminución en los niveles celulares de SIRPA comprende una disminución en los niveles totales de SIRPA. Como se usa en la presente, un anticuerpo anti-SIRPA disminuye los niveles totales de SIRPA si éste induce una disminución del 25% o más en los niveles totales de SIRPA según se mide por medio de cualquier ensayo basado en células *in vitro* o modelo *in vivo* adecuado descrito en la presente o conocido en la técnica, *por ejemplo* inmunotinción, análisis de Western

blot, coimmunoprecipitación, y citometría celular. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA inducen la degradación de SIRPA, la escisión de SIRPA, la internalización de SIRPA, el desprendimiento de SIRPA, la regulación hacia abajo de la expresión de SIRPA, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los niveles celulares de SIRPA se miden sobre las células primarias (*por ejemplo*, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, monocitos, microglía, y macrófagos) o sobre líneas celulares utilizando un ensayo celular de SIRPA.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA con regulación hacia abajo tiene una IC₅₀ de 200 nM de menos, típicamente 100 nM o menos (se regula hacia abajo 50% de SIRPA expresado sobre la superficie celular), luego de 4 horas de exposición de macrófagos humanos al anticuerpo a 37°C. En algunas realizaciones, SIRPA permanece regulado hacia abajo durante al menos 24 horas de exposición a un anticuerpo de la presente invención. Las células pueden analizarse para la expresión de la superficie celular de SIRPA utilizando cualquier tecnología, *por ejemplo*, citometría de flujo.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación disminuyen los niveles celulares de SIRPA en al menos 25%, al menos 26%, al menos 27%, al menos 28%, al menos 29%, al menos 30%, al menos 31%, al menos 32%, al menos 33%, al menos 34%, al menos 35%, al menos 36%, al menos 37%, al menos 38%, al menos 39%, al menos 40%, al menos 41%, al menos 42%, al menos 43%, al menos 44%, al menos 45%, al menos 46%, al menos 47%, al menos 48%, al menos 49%, al menos 50%, al menos 51%, al menos 52%, al menos 53%, al menos 54%, al menos 55%, al menos 56%, al menos 57%, al menos 58%, al menos 59%, al menos 60%, al menos 61%, al menos 62%, al menos 63%, al menos 64%, al menos 65%, al menos 66%, al menos 67%, al menos 68%, al menos 69%, al menos 70%, al

menos 71%, al menos 72%, al menos 73%, al menos 74%, al menos 75%, al menos 76%, al menos 77%, al menos 78%, al menos 79%, al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o más según se compara con los niveles celulares de SIRPA en ausencia del anticuerpo anti-SIRPA.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las actividades de regulación hacia abajo sintetizadas en los párrafos anteriores, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación inhibe el agrupamiento de la superficie celular de SIRPA.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación regula hacia abajo a SIRPA, pero no bloquea, inhibe, o reduce la unión de un ligando de SIRPA, *por ejemplo*, CD47, a SIRPA. En el contexto de la presente invención, un anticuerpo dirigido contra SIRPA que no bloquea la unión de CD47 a SIRPA se refiere a un anticuerpo que no resulta en una disminución significativa en la unión de CD47 a SIRPA cuando el anticuerpo se incuba con CD47 y células que expresan SIRPA. Una “disminución significativa” en el contexto de la unión de CD47 a SIRPA se refiere a una disminución en la unión del 30% o menos, típicamente al menos 25%, al menos 20%, al menos 15%, o al menos 10% o menos en comparación con la unión de CD47 a SIRPA en presencia de un anticuerpo de control emparejado con isotipos que no se une a SIRPA. En los Ejemplos en la presente se determina un ensayo ilustrativo para evaluar la actividad de bloqueo. Por ejemplo, células que expresan SIRPA de humano, *por ejemplo*, macrófagos humanos o células tales como células CHO que son modificadas para expresar de modo recombinante el SIRPA de humano,

se colocan en placas a 105 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, se lavan, y se incuban en 100 µl tampón para la clasificación de células activadas por fluorescencia conteniendo 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal o control de isotipo. Luego las células se lavan y se incuban con CD47 humana soluble durante 30 minutos sobre hielo. Luego las células se analizan en cuanto a CD47 unida a superficie.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente invención regula hacia abajo la expresión de CD32A/B en las células (*es decir*, FcγRIIA/FcγRIIB). En algunas realizaciones, la regulación hacia abajo de la expresión de CD32A/B (*es decir*, FcγRIIA/FcγRIIB) en las células es la expresión de la superficie celular de CD32A/B (*es decir*, FcγRIIA/FcγRIIB) reducida. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación regula hacia abajo la expresión de CD32A/B en los macrófagos (*por ejemplo*, macrófagos humanos). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación regula hacia abajo la expresión de CD32A (*es decir*, FcγRIIA) en los macrófagos (*por ejemplo*, macrófagos humanos). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente invención regula hacia abajo la expresión de CD32B (*es decir*, FcγRIIB) en los macrófagos (*por ejemplo*, macrófagos humanos). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación regula hacia abajo la expresión de la superficie celular de CD32A (*es decir*, FcγRIIA) en los macrófagos humanos en aproximadamente 75%, en aproximadamente 80%, o en aproximadamente 85% en comparación con el nivel de la expresión de la superficie celular de CD32A en los macrófagos humanos no tratados con un anticuerpo anti-SIRPA de la presente invención. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación regula hacia abajo la expresión de la superficie celular de CD32A en los macrófagos humanos en aproximadamente 70-85% en comparación con el nivel de la

expresión de la superficie celular de CD32A en los macrófagos humanos no tratados con un anticuerpo anti-SIRPA de la presente invención. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación regula hacia abajo la expresión de la superficie celular de CD32B (*es decir*, FcγRIIB) en los macrófagos humanos hasta niveles indetectables.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos, tales como anticuerpos aislados (*por ejemplo*, monoclonales), que interactúan con o de otra manera se unen a una región, tal como un epítopo, dentro de una proteína de SIRPA de la presente divulgación. En algunas realizaciones, los anticuerpos interactúan con o de otra manera se unen a una región, tal como un epítopo, dentro de una proteína de SIRPA de la presente divulgación con cinética perfeccionada/mejorada (*por ejemplo*, en relación con un anticuerpo anti-SIRPA que tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5). En algunas realizaciones, los anticuerpos interactúan con o de otra manera se unen a una región, tal como un epítopo, dentro de una proteína de SIRPA sobre células humanas, tales como las células dendríticas, células mieloides, monocitos, macrófagos, etc. con una concentración efectiva media-máxima (EC₅₀) que es inferior que aquella de un anticuerpo de control (*por ejemplo*, en relación con un anticuerpo anti-SIRPA que tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5). En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación se unen a una proteína de SIRPA y modulan una o más actividades de SIRPA luego de unirse a la proteína de SIRPA, por ejemplo, una actividad asociada con la expresión de SIRPA sobre una célula. Las proteínas de SIRPA de la presente divulgación incluyen, sin

limitación, una proteína de SIRPA de mamífero, una proteína de SIRPA de humano, una proteína de SIRPA de ratón, una proteína cyno SIRPA, y una proteína de SIRPA de rata.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación pueden unirse a SIRPA en una manera dependiente del pH. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación pueden unirse a SIRPA a un pH neutro y ser internalizados sin disociarse de la proteína de SIRPA. Alternativamente, a un pH ácido, los anticuerpos de la presente divulgación pueden disociarse de SIRPA una vez que ellos son internalizados y son luego degradados por la vía endosoma/lisosoma. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA se une a SIRPA a un pH que tiene un rango desde 5,5 a 8,0, desde 5,5 a 7,5, desde 5,5 a 7,0, desde 5,5 a 6,5, desde 5,5 a 6,0, desde 6,0 a 8,0, desde 6,5 a 8,0, desde 7,0 a 8,0, desde 7,5 a 8,0, desde 6,0 a 7,5, desde 6,0 a 7,0, desde 6,5 a 7,5, En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA se disocia de SIRPA a un pH inferior a 6,0, inferior a 5,5, inferior a 5,0, inferior a 4,5, inferior a 4,0, inferior a 3,5, inferior a 3,0, inferior a 2,5, o inferior a 2,0.

SIRPA es una proteína de membrana tipo y de un solo paso. Dentro de la secuencia de aminoácidos de SIRPA de humano (SEQ ID NO:1), un dominio extracelular está ubicado en los residuos de aminoácidos 31-373; un dominio transmembrana está ubicado en los residuos de aminoácidos 374-394; y un dominio intracelular está ubicado en los residuos de aminoácidos 395-504. SIRPA de humano comprende un único conjunto V y dos conjuntos C1 de dominios de la superfamilia Ig (IgSF), a los que se hace referencia como el dominio D1, el dominio D2, y el dominio D3, respectivamente. El dominio D1 comprende los residuos de aminoácidos 32-137 de SIRPA de humano; el dominio D2 comprende los residuos de aminoácidos 148-247 de SIRPA de humano; y el dominio D3 comprende los residuos de aminoácidos 254-348 de SIRPA de humano. Según

apreciará un técnico en la materia, los residuos iniciales y finales de los dominios de la presente divulgación pueden variar dependiendo del programa de modelado por computadora utilizado o del método utilizado para la determinación del dominio

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une al dominio D3 de SIRPA. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une al dominio D3 de SIRPA de humano que comprende los residuos de aminoácidos 254-348 de la secuencia de aminoácidos de SIRPA de humano de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une a un epítipo dentro del dominio D3 de SIRPA de humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une a un epítipo dentro del dominio D3 de SIRPA de humano, en donde el epítipo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de los residuos de aminoácidos 254-348, residuos de aminoácidos 254-274, residuos de aminoácidos 264-279, residuos de aminoácidos 274-289, residuos de aminoácidos 273-331, residuos de aminoácidos 281-315, residuos de aminoácidos 281-337, residuos de aminoácidos 284-299, residuos de aminoácidos 294-309, residuos de aminoácidos 304-319, residuos de aminoácidos 314-329, residuos de aminoácidos 324-339, y residuos de aminoácidos 334-348 de la secuencia de aminoácidos de SIRPA de humano de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une a un epítipo dentro del dominio D3 de SIRPA de humano, en donde el epítipo incluye los residuos de aminoácidos R282, Q284, y G337 de la secuencia de aminoácidos de SIRPA v1 de humano (SEQ ID NO:1). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une a un epítipo dentro del dominio D3 de SIRPA de humano, en donde el epítipo incluye los residuos de aminoácidos Q281,

R282, Q284, L285, W287, R295, E297, V302, y W315 de la secuencia de aminoácidos de SIRPA v1 de humano (SEQ ID NO:1).

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une al dominio D3 de SIRPA, *por ejemplo*, SIRPA de humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se une al mismo epítipo de SIRPA o parte del epítipo de SIRPA unido por un anticuerpo que tiene las CDRs del anticuerpo designadas como m3F9 según se describe en la presente. En consecuencia, en algunas realizaciones, un anticuerpo de la presente divulgación se une al mismo epítipo de SIRPA o parte del epítipo de SIRPA unido por un anticuerpo que tiene las CDRs del anticuerpo designadas como m3F9 según se describe en la presente.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se basan, al menos en parte, en la identificación de anticuerpos anti-SIRPA que presentan una o más características funcionales perfeccionadas y/o mejoradas (*por ejemplo*, en relación con un anticuerpo anti-SIRPA que tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5), que incluyen, una capacidad perfeccionada/mejorada para disminuir los niveles de superficie celular de SIRPA sobre las células, resultando en la reducción, neutralización, prevención, o detención de una o más actividades de SIRPA, que incluyen, sin limitación, la reducción del crecimiento celular de monocitos, macrófagos, células T, células dendríticas y/o microglía; la reducción de la proliferación de células T inducida por las células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, monocitos, microglía, microglía de M1, microglía de M1 activada, microglía de M2, macrófagos, macrófagos M1, macrófagos M1 y/o macrófagos M2 activados; disminución de la supervivencia de neutrófilos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea,

macrófagos, células NK, macrófagos M1, neutrófilos M1, células NK M1, macrófagos M1 activados, neutrófilos M1 activados, células NK M1 activadas, macrófagos M2, neutrófilos M2, células NK M2, monocitos, osteoclastos, células T, células T auxiliares, células T citotóxicas, granulocitos, microglía, microglía de M1, microglía de M1, y/o microglía de M2 activada; la disminución o reducción de la proliferación de neutrófilos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, macrófagos, células NK, macrófagos M1, neutrófilos M1, células NK M1, macrófagos M1 activados, neutrófilos M1 activados, células NK M1 activadas, macrófagos M2, neutrófilos M2, células NK M2, monocitos, osteoclastos, células T, células T auxiliares, células T citotóxicas, granulocitos, microglía, microglía de M1, microglía de M1, y/o microglía de M2 activada; inhibición de la migración de neutrófilos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, macrófagos, células NK, macrófagos M1, neutrófilos M1, células NK M1, macrófagos M1 activados, neutrófilos M1 activados, células NK M1 activadas, macrófagos M2, neutrófilos M2, células NK M2, monocitos, osteoclastos, células T, células T auxiliares, células T citotóxicas, granulocitos, microglía, microglía de M1, microglía de M1, y/o microglía de M2 activada; la disminución o inhibición de una o más funciones de los neutrófilos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, macrófagos, células NK, macrófagos M1, neutrófilos M1, células NK M1, macrófagos M1 activados, neutrófilos M1 activados, células NK M1 activadas, macrófagos M2, neutrófilos M2, células NK M2, monocitos, osteoclastos, células T, células T auxiliares, células T citotóxicas, granulocitos, microglía, microglía de M1, microglía de M1, y/o microglía de M2 activada; la reducción de la proliferación de monocitos, macrófagos, células T, células dendríticas, neutrófilos, y/o microglía; la reducción de la funcionalidad total de los monocitos, macrófagos, células T, células dendríticas, neutrófilos, y/o microglía; la inhibición de la beneficiosa respuesta

inmune a diferentes tipos de cáncer seleccionados de cáncer de vejiga, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, linfoma de no Hodgkin, leucemia mieloide aguda, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, fibrosarcoma, y cáncer de tiroides; la inhibición de la beneficiosa respuesta inmune a diferentes tipos de trastornos neurológicos seleccionados de demencia, demencia frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia mixta, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hidrocefalia de presión normal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de tauopatía, enfermedad de Nasu-Hakola, accidente cerebrovascular, trauma agudo, trauma crónico, temblor esencial, enfermedad de Behcet, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples, síndrome de Shy-Drager, parálisis supranuclear progresiva, degeneración gangliónica basal cortical, encefalomiелitis aguda diseminada, trastornos granulomatosos, Sarcoidosis, enfermedades del envejecimiento, convulsiones, lesión de la médula espinal, lesión cerebral traumática, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, retinitis pigmentosa, degeneración de la retina, y esclerosis múltiple; la unión a ligando de SIRPA sobre las células tumorales; la unión a ligando de SIRPA sobre las células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, monocitos, microglía, células T, neutrófilos, y/o macrófagos; inhibición de las células tumorales mediante el exterminio de uno o más de microglía, macrófagos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, neutrófilos, células T, células T auxiliares, o células T citotóxicas; la inhibición de la actividad de proliferación de células antitumorales de uno o más de microglía, macrófagos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, neutrófilos, células T, células T

auxiliares, o células T citotóxicas; la inhibición de la actividad de metástasis celular antitumoral de uno o más de microglía, macrófagos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, neutrófilos, células T, células T auxiliares, o células T citotóxicas; la expresión modulada de uno o más receptores inflamatorios, tales como CD86, expresados en uno o más de microglía, macrófagos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de la médula ósea, neutrófilos, células T, células T auxiliares, o células T citotóxicas; el mejoramiento de la infiltración de uno o más de células dendríticas inmunosupresoras, macrófagos inmunosupresores, células supresoras derivadas de mieloides, macrófagos asociados a tumores, neutrófilos inmunosupresores, y células T reguladoras dentro de tumores; la promoción o el rescate de la funcionalidad de uno o más de células dendríticas inmunosupresoras, macrófagos inmunosupresores, neutrófilos inmunosupresores, células NK inmunosupresoras, células supresoras derivadas de mieloides, macrófagos asociados a tumores, neutrófilos asociados a tumores, células NK asociadas a tumores, y células T reguladoras; el aumento de la infiltración de uno o más de células dendríticas inmunosupresoras, macrófagos inmunosupresores, neutrófilos inmunosupresores, células NK inmunosupresoras, células supresoras derivadas de mieloides, macrófagos asociados a tumores, neutrófilos asociados a tumores, células NK asociadas a tumores, células mieloides CD45+CD14+ no tumorigénicas, y células T reguladoras dentro de tumores; el incremento de la cantidad de células inmunosupresoras mieloides/granulocíticas que promueven los tumores en un tumor, en sangre periférica, u otro órgano linfoide; el mejoramiento de la actividad promotora de tumores de las células supresoras derivadas de mieloides; la disminución de la activación de linfocitos T específicos de tumores con potencial de exterminio de tumores; el mejoramiento de la supervivencia de las células supresoras derivadas de mieloides no tumorigénicas y/o células mieloides

CD45+CD14+ no tumorigénicas; la disminución de la infiltración y/o activación de linfocitos T específicos de tumores con potencial de exterminio de tumores; el aumento de la tasa de crecimiento tumoral; el aumento de la tasa de recurrencia del tumor; la disminución de la eficacia de una o más terapias inmunes que modulan las respuestas de las células T antitumorales, opcionalmente en donde la una o más terapias inmunes son terapias inmunes que se focalizan en una o más proteínas seleccionadas de CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD39, CD70, TREM1, TREM2, Siglec-5, Siglec-7, Siglec-9, Siglec-11, SIRPA, CD447, receptor del CSF-1, y cualquier combinación de los mismos, o de uno o agentes quimioterapéuticos y/o más vacunas para el cáncer.

En algunas realizaciones, las cuales pueden combinarse con cualquiera de las otras realizaciones anteriores, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación induce, mejora, o aumenta una o más actividades, que incluyen: (i) aumentar la cantidad de células T CD3+ infiltrantes de tumores; (ii) disminuir los niveles celulares de SIRPA en células mieloides CD14+ no tumorigénicas, opcionalmente en donde las células mieloides CD14+ no tumorigénicas son células infiltrantes de tumores u opcionalmente en donde las células mieloides CD14+ no tumorigénicas se encuentran presentes en la sangre; (iii) reducir la cantidad de células mieloides CD14+ no tumorigénicas, opcionalmente en donde las células mieloides CD14+ no tumorigénicas son células infiltrantes de tumores u opcionalmente en donde las células mieloides CD14+ no tumorigénicas se encuentran presentes en la sangre; (iv) reducir los niveles de PD-L1, PD-L2, B7-H2, B7-H3, CD200R, CD163, y/o CD206 en una o más células, opcionalmente en donde la una o más células son células supresoras derivadas de mieloides no tumorigénicas (MDSC); (v) disminuir la tasa de crecimiento tumoral de los tumores

sólidos; (vi) reducir el volumen del tumor; (vii) aumentar la eficacia de uno o más inhibidores de PD-1; (viii) aumentar la eficacia de una o más terapias con inhibidores de punto de control y/o de las terapias inmunomoduladoras, opcionalmente en donde la una o más terapias con inhibidores de punto de control y/o de las terapias inmunomoduladoras se focalizan en uno o más de CTL4, la vía de la adenosina, PD-L1, PD-L2, OX40, TIM3, LAG3, o cualquier combinación de los mismos; (ix) aumentar la eficacia de uno o más agentes quimioterapéuticos, opcionalmente en donde el uno o más agentes quimioterapéuticos son gemcitabina, capecitabina, antraciclinas, doxorrubicina (Adriamycin®), epirubicina (Ellence®), taxanos, paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), 5-fluorouracilo (5-FU), ciclofosfamida (Cytosan®), carboplatino (Paraplatin®), y cualquier combinación de los mismos; (x) i aumentar la proliferación de las células T en presencia de células supresoras derivadas de mieloides no tumorigénicas (MDSC); (xi) inhibir la diferenciación, supervivencia, y/o una o más funciones de las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) no tumorigénicas (MDSC); y (xii) exterminar a las células mieloides no tumorigénicas inmunosupresoras que expresan CD33 y/o a las células que expresan CD14 no tumorigénicas en los tumores sólidos y a los vasos sanguíneos relacionados cuando se conjugan con una toxina química o radioactiva.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación disminuye la actividad, funcionalidad, o supervivencia de las células T reguladoras, células dendríticas inmunosupresoras incrustadas en el tumor, macrófagos inmunosupresores incrustados en el tumor, células supresoras derivadas de mieloides, macrófagos asociados a tumores, células de leucemia mieloide aguda (AML), células de leucemia linfocítica crónica (CLL), o leucemia mieloide crónica (CML).

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación induce o promueve la supervivencia, maduración, funcionalidad, migración, o proliferación de una o más células inmunes, *por ejemplo*, una o más células inmunes están seleccionadas de células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, células NK, microglía, células T, células T auxiliares, células T citotóxicas, y cualquier combinación de las mismas en un individuo.

Afinidad de unión al anticuerpo anti-SIRPA

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente, el anticuerpo tiene una constante de disociación (K_d) de $< 1 \mu\text{M}$, $< 100 \text{ nM}$, $< 10 \text{ nM}$, $< 1 \text{ nM}$, $< 0,1 \text{ nM}$, $< 0,01 \text{ nM}$, o $< 0,001 \text{ nM}$ (*por ejemplo*, 10^{-8} M o menor, *por ejemplo*, desde 10^{-8} M a 10^{-13} M , *por ejemplo*, desde 10^{-9} M a 10^{-13} M). Las constantes de disociación pueden determinarse a través de cualquier técnica analítica, incluyendo cualquier técnica bioquímica o biofísica tal como ELISA, resonancia de plasmones superficiales (SPR), interferometría de biocapa (véase, *por ejemplo*, Octet System by ForteBio), calorimetría isoterma de titulación (ITC), calorimetría diferencial de barrido (DSC), dicroísmo circular (CD), análisis de flujo detenido, y análisis colorimétricos o fluorescentes de fusión de proteínas. En una realización, K_d se mide a través de un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA). En alguna realización, un RIA se lleva a cabo con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno, *por ejemplo* según se describe en Chen et al. J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). En algunas realizaciones, K_d se mide utilizando un ensayo de resonancia de plasmones superficiales BIACORE, *por ejemplo*, un ensayo utilizando un BIACORE -2000 o un BIACORE -3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) se lleva a cabo a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizados a ~ 10 unidades de respuesta (RU). En algunas realizaciones, la K_D se determina utilizando un anticuerpo monovalente (*por ejemplo*, un Fab) o un

anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, la K_D se determina utilizando un anticuerpo de longitud completa en una forma monovalente.

Fragmentos de anticuerpos

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente, los anticuerpos de anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, y scFv, y otros fragmentos que se describen a continuación. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, véase Hudson et al. *Med. Nat.* 9:129-134 (2003). Para una revisión de fragmentos scFv, véase, *por ejemplo*, WO 93/16185; y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5571894 y 5587458. Para un debate de fragmentos Fab y $F(ab')_2$ que comprenden residuos del epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen una incrementada vida media *in vivo*, véase la Patente de los Estados Unidos No. 5869046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, *por ejemplo*, EP404097; WO 1993/01161; Hudson et al. *Med. Nat.* 9:129-134 (2003). Los triacuerpos y los tetracuerpos también se describen en Hudson et al. *Med. Nat.* 9:129-134 (2003). Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo o una porción del dominio variable de cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (véase, *por ejemplo*, la Patente de los Estados Unidos No. 6248516).

Los fragmentos de anticuerpos pueden elaborarse a través de diversas técnicas, que incluyen pero no se limitan a la digestión proteolítica de un

anticuerpo intacto así como también la producción a través de células huésped recombinantes (*por ejemplo*, *E. coli* o fago), según se describe en la presente.

Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. Ciertos anticuerpos quiméricos se describen, *por ejemplo*, en la Patente de los Estados Unidos No. 4816567. En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (*por ejemplo*, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo, o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo “de clase cambiada” en el cual la clase o subclase ha sido cambiada de aquélla del anticuerpo parental. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígenos de los mismos.

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano es humanizado para reducir la inmunogenicidad a los humanos, mientras mantiene la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano parental. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado es sustancialmente no inmunogénico en humanos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado tiene sustancialmente la misma afinidad para un blanco que un anticuerpo de otra especie a partir de la cual se deriva el anticuerpo humanizado. Véase, *por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos No. 5530101, 5693761; 5693762; y 5585089. En ciertas realizaciones, se identifican los aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo que pueden ser modificados sin disminuir la afinidad nativa del dominio de unión a antígenos mientras reducen su inmunogenicidad. Véase, *por ejemplo*, la Patente de los Estados Unidos Nos.

5766886 y 5869619. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los cuales las HVRs (o porciones de las mismas) se derivan a partir de un anticuerpo no humano, y los FRs (o porciones de los mismos) se derivan a partir de secuencias de anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado están sustituidos con los correspondientes residuos a partir de un anticuerpo no humano (*por ejemplo*, el anticuerpo a partir del cual se derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo .

Se efectúa una revisión de los anticuerpos humanizados y de los métodos de su elaboración, *por ejemplo*, en Almagro et al. *Front. Biosci.* 13:161 9-1633 (2008), y se describen además, *por ejemplo*, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5821337, 7527791, 6982321, y 7087409. Las regiones marco humanas que pueden utilizarse para la humanización incluyen pero no se limitan a: regiones marco seleccionadas utilizando el método de “mejor ajuste” (*véase, por ejemplo*, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (*véase, por ejemplo*, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); y Presta et al., *J. Immunol.* 151 :2623 (1993)); regiones marco maduras humanas (mutadas somáticamente) o regiones marco de línea germinal humana (*véase, por ejemplo*, Almagro y Fransson *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones marco derivadas de bibliotecas de cribado de FR (*véase, por ejemplo*, Baca et al. *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok et al. *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

Anticuerpos Humanos

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse utilizando diversas técnicas según se conoce en la materia. Los anticuerpos humanos se describen generalmente en van Dijk et al. *Opin. Act. Farmacol.* 5:368-74 (2001) y Lonberg *Opin. Act. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración de un inmunogen a un animal transgénico que ha sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a un desafío antigénico. Uno puede ingeniar cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con fragmentos largos de los sitios de Ig humana en anticipación a que dichos ratones producirían anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los largos fragmentos de Ig humana pueden preservar la amplia diversidad génica variable así como también la apropiada regulación de la producción y expresión del anticuerpo. Al aprovechar la maquinaria del ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a las proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducidos en estas cepas de ratón puede producir anticuerpos humanos completos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Utilizando la tecnología de hibridoma, pueden producirse y seleccionarse mAbs humanos antígeno específicos con la especificidad deseada. Ciertos métodos ejemplificativos están descritos en las Patentes de los Estados Unidos No. 5545807, EP 546073, y EP 546073. Véase también, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6075181 y 6150584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la Patente de los Estados Unidos No. 5770429 que describe la tecnología HUMAB®; la Patente de los Estados Unidos No. 7041870 que describe la tecnología K-M MOUSE®, y la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US

2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®. Las regiones variables humanas a partir de anticuerpos intactos generados por dichos animales puede modificarse además, *por ejemplo*, mediante la combinación con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también pueden ser elaborados por medio de métodos basados en hibridomas. Se han descrito líneas celulares de heteromiéloma de ratón-humano y de miéloma humano para la producción de anticuerpos humanos monoclonales. (Véase, *por ejemplo*, Kozbor *J. Immunol.* 133:3001 (1984) y Boerner et al. *J. Immunol.* 147:86 (1991)). Los anticuerpos humanos generados por medio de la tecnología del hibridoma de células B humanas también están descritos en Li et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 103:3557-3562 (2006). Los métodos adicionales incluyen aquéllos descritos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 7189826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma). La tecnología del hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers et al. *Histología e Histopatología* 20(3):927-937 (2005) y Vollmers et al. *Métodos y Hallazgos en Farmacología Experimental y Clínica* 27(3):185-91 (2005). Los anticuerpos humanos también pueden ser generados mediante el aislamiento de secuencias de dominio variable de clon Fv seleccionadas de bibliotecas de visualización de fagos derivados de humanos. Luego dichas secuencias de dominio variable pueden combinarse con un dominio constante humano deseado. A continuación se describen técnicas para seleccionar anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de anticuerpos.

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente, el anticuerpo es un anticuerpo humano aislado a través de métodos *in vitro* y/o del cribado de bibliotecas combinatorias para los anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Los ejemplos adecuados incluyen pero

no se limitan a visualización de fagos (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (anteriormente Proliferon), Affimed) visualización del ribosoma (CAT), visualización de levaduras (Adimab), y similares. En ciertos métodos de visualización de fagos, repertorios de genes VH y VL se clonan por separado mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que luego pueden cribarse para el fago de unión a antígeno según se describe en Winter et al. *Ann. Rev. Immunol.* 12: 433-455 (1994). Por ejemplo, en la técnica son conocidos una variedad de métodos para generar bibliotecas de visualización de fagos y el cribado de dichas bibliotecas para que los anticuerpos posean las características de unión deseadas. Véase también Sidhu et al. *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310, 2004; Lee et al. *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093, 2004; Fellouse *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); y Lee et al. *J. Métodos Immunol.* 284(- 2):1 19-132 (2004). Los fagos típicamente despliegan fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv de cadena única (scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas a partir de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad con el inmunogen sin el requerimiento de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio ingenuo puede ser clonado (*por ejemplo*, a partir de un humano) para proporcionar una fuente única de anticuerpos hasta un amplio rango de antígenos no propios y también autoantígenos sin inmunización alguna según se describe por Griffiths et al. *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). Finalmente, también pueden elaborarse bibliotecas ingenuas por medio de síntesis a través de la clonación de segmentos de gen V no reorganizados a partir de células madre, y utilizando cebadores para PCR que comprenden una secuencia aleatoria para codificar a las regiones HVR3 altamente variables y para lograr la reorganización *in vitro*, según se describe por Hoogenboom et al. *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388, 1992. Las publicaciones de patentes que describen

bibliotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: La Patente de Estados Unidos No. 5750373, y la Publicación de Patente de Estados Unidos Nos. 2007/0292936 y 2009/0002360. Los anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de anticuerpos humanos en la presente se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos.

Regiones Constantes que Incluyen Regiones Fc

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos anti-SIRPA proporcionados en la presente, el anticuerpo comprende un Fc. En algunas realizaciones, el Fc es un isotipo de IgG1, IgG2, IgG3, y/o IgG4 humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo es de la clase IgG, de la clase IgM, o de la clase IgA.

En ciertas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos anti-SIRPA proporcionados en la presente, el anticuerpo tiene un isotipo de IgG2. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA contiene una región constante de IgG2 humana. En algunas realizaciones, la región constante de IgG2 humana incluye una región Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA induce la una o más actividades de SIRPA o independientemente de la unión a un receptor Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA se une a un receptor Fc inhibidor. En ciertas realizaciones, el receptor Fc inhibidor es el receptor Fc gamma IIB inhibidor (FcγIIB).

En ciertas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente, el anticuerpo tiene un isotipo de IgG1. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA contiene una región constante de IgG1 de ratón. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA contiene una región constante de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la región constante de IgG1 humana incluye una región Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA se une

a un receptor Fc inhibidor. En ciertas realizaciones, el receptor Fc inhibidor es el receptor Fc gamma IIB inhibidor (Fc γ IIB).

En ciertas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos anti-SIRPA proporcionados en la presente, el anticuerpo tiene un isotipo de IgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA contiene una región constante de IgG4 humana. En algunas realizaciones, la región constante de IgG4 humana incluye una región Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA se une a un receptor Fc inhibidor. En ciertas realizaciones, el receptor Fc inhibidor es el receptor Fc gamma IIB inhibidor (Fc γ IIB).

En ciertas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos anti-SIRPA proporcionados en la presente, el anticuerpo tiene un isotipo de IgG2/4 híbrido. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA incluye una secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 118 a 260 de acuerdo con la numeración EU de IgG2 humana y los aminoácidos 261-447 de acuerdo con la numeración EU de IgG4 humana (WO 1997/11971; WO 2007/106585).

En algunas realizaciones, la región Fc aumenta el agrupamiento sin activar el complemento según se compara con un correspondiente anticuerpo que comprende una región Fc que no comprende las sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, el anticuerpo induce una o más actividades de un blanco específicamente unido por el anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a SIRPA.

También puede ser deseable modificar un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación para modificar la función efectora y/o para aumentar la vida media en suero del anticuerpo. Por ejemplo, el sitio de unión al receptor Fc sobre la región constante puede ser modificado o mutado para eliminar o reducir la afinidad de unión a ciertos receptores Fc, tales como Fc γ RI, Fc γ RII, y/o Fc γ RIII para reduce la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos. En

algunas realizaciones, la función efectora es emparejada mediante la remoción de la N-glicosilación de la región Fc (*por ejemplo*, en el dominio CH2 de IgG) del anticuerpo. En algunas realizaciones, la función efectora es emparejada mediante la modificación de regiones tales como 233-236, 297, y/o 327-331 de IgG humana según se describe en WO 99/58572 y Armour et al. *Inmunología Molecular* 40: 585-593 (2003); Reddy et al. *J. Inmunología* 164:1925-1933 (2000). En otras realizaciones, también puede ser deseable modificar un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación para modificar la función efectora para aumentar el encuentro de selectividad hacia el FcγRIIb que contiene ITIM (CD32b) para aumentar el agrupamiento de anticuerpos SIRPA sobre las células adyacentes sin activar respuestas humorales que incluyen a la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos y la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos.

Para aumentar la vida media en suero del anticuerpo, uno puede incorporar epítipo de unión al receptor de rescate dentro del anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) según se describe en la Patente de los Estados Unidos 5739277, por ejemplo. Como se usa en la presente, el término “*epítipo de unión al receptor de rescate*” se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4) que es responsable del aumento de la vida media en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

Anticuerpos Multiespecíficos

Multiespecíficos son los anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes, incluyendo aquéllos sobre el mismo u otro polipéptido (*por ejemplo*, uno o más polipéptidos de SIRPA de la presente divulgación). En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico puede ser un anticuerpo biespecífico. En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico puede ser un anticuerpo triespecífico. En algunas realizaciones, el anticuerpo

multiespecífico puede ser un anticuerpo tetraespecífico. Dichos anticuerpos pueden ser derivados de anticuerpos de longitud completa o de fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$). En algunas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico comprende una primera región de unión a antígeno la cual se une a un primer sitio sobre SIRPA y comprende una segunda región de unión a antígeno la cual se une a un segundo sitio sobre SIRPA. En alguna realización, los anticuerpos multiespecíficos comprenden una primera región de unión a antígeno la cual se une a SIRPA y una segunda región de unión a antígeno que se une a un segundo polipéptido.

En la presente se proporcionan anticuerpos multiespecíficos que comprenden una primera región de unión a antígeno, en donde la primera región de unión a antígeno comprende las seis HVRs de un anticuerpo descrito en la presente, el cual se une a SIRPA y una segunda región de unión a antígeno que se une a un segundo polipéptido. En algunas realizaciones, la primera región de unión a antígeno comprende el VH o VL de un anticuerpo descrito en la presente.

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos, el segundo polipéptido es un antígeno que facilita el transporte a través de la barrera hematoencefálica. En la técnica son conocidos numerosos antígenos y péptidos que facilitan el transporte a través de la barrera hematoencefálica (*véase, por ejemplo*, Gabathuler R. *Neurobiol. Dis.* 37:48-57 (2010)). Dichos segundos antígenos y péptidos incluyen, sin limitación, al receptor de transferrina (TR), receptor de insulina (HIR), receptor del factor de crecimiento tipo insulínico (IGFR), proteínas 1 y 2 relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LPR-1 y 2), receptor de toxina diftérica, incluyendo CRM197 (un mutante no tóxico de la toxina diftérica), TMEM 30(A) (Flipasa), dominios de transducción de proteínas tales como TAT, Syn-B, o penetratina, poli-arginina o

péptidos generalmente cargados positivamente, péptidos Angiopep tales como ANG1005 (véase, *por ejemplo*, Gabathuler, 2010), y otras proteínas de superficie celular que están enriquecidas sobre las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (véase, *por ejemplo*, Daneman et al. *PLoS One* 5(10):e13741 (2010)).

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos, el segundo polipéptido es una proteína causante de enfermedades seleccionada de beta amiloide, beta amiloide oligomérica, placas beta amiloides, proteína precursora de amiloide o fragmentos de la misma, Tau, IAPP, alfa-sinucleína, TDP-43, proteína FUS, C9orf72 (marco abierto de lectura- región codificante de proteína- número 72 del cromosoma 9), proteína c9RAN, proteína priónica, PrPSc, huntingtina, calcitonina, superóxido dismutasa, ataxina, ataxina 1, ataxina 2, ataxina 3, ataxina 7, ataxina 8, ataxina 10, cuerpos de Lewy, factor natriurético atrial, polipéptido amiloide de los islotes, insulina, apolipoproteína AI, suero amiloide A, medina, prolactina, transtiretina, lisozima, microglobulina beta 2, gelsolina, queratoepitelina, cistatina, AL de cadena ligera de inmunoglobulina, proteína S-IBM, productos de traducción repetida no asociada a ATG (RAN), péptidos de repetición dipeptídica (DPR), péptidos de repetición de glicina-alanina (GA), péptidos de repetición de glicina-prolina (GP), péptidos de repetición de glicina-arginina (GR), péptidos de repetición de prolina-alanina (PA), ubiquitina, y péptidos de repetición de prolina-arginina (PR); (d) ligandos y/o proteínas expresados en células inmunes, en donde los ligandos y/o proteínas seleccionados de CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA-4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, BTLA, KIR, GAL9, TIM3, A2AR, LAG-3, y fosfatidilserina; y/o (e) una proteína, lípido, polisacárido, o glucolípido expresados en una o más células tumorales y cualquier combinación de los mismos.

Los anticuerpos multivalentes pueden reconocer el antígeno de SIRPA así como también, sin limitación, antígenos adicionales, tales como un antígeno de péptido A β , un antígeno de α -sinucleína-proteína, antígeno de proteína Tau, antígeno de proteína TDP-43, antígeno de proteína priónica, antígeno de proteína huntingtina, antígeno de productos de traducción de RAN (incluyendo las Repeticiones de DiPéptidos,(Péptidos DPRs) compuestos de glicina-alanina (GA), glicina-prolina (GP), glicina-arginina (GR), prolina-alanina (PA), o prolina-arginina (PR)), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, o receptor de transferrina o cualquier otro antígeno que facilite la transferencia del anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es transferrina. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es Tau. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es A β . En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es TREM2. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es α -sinucleína.

El anticuerpo multivalente contiene al menos una cadena de polipéptidos (y con preferencia dos cadenas de polipéptidos), en donde la cadena o cadenas de polipéptidos comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas de polipéptidos pueden comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptidos de una región Fc, X1 y X2 representa un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. De modo similar, la cadena o cadenas de polipéptidos pueden comprender una cadena VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-región Fc; o una cadena VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente en la presente con preferencia comprende además al menos dos (y con preferencia cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en la presente puede, por ejemplo, comprender desde aproximadamente dos hasta aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los

polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

Las técnicas para elaborar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, la co-expresión recombinante de dos pares de cadena pesada - cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello *Naturaleza* 305: 537 (1983), WO 93/08829, y Traunecker et al. *EMBO J.* 10:3655 (1991)), e ingeniería “perillas en agujeros” (véase, *por ejemplo*, la Patente de los Estados Unidos No. 5731168). Véase también WO 2013/026833 (CrossMab). Los anticuerpos multiespecíficos también pueden elaborarse mediante efectos de dirección de ingeniería electrostática para elaborar moléculas heterodiméricas de anticuerpo Fc (WO 2009/089004A1); el entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (véase, *por ejemplo*, la Patente de Estados Unidos No. 4676980); utilizando leucina; utilizando tecnología de “diacuerpos” para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, *por ejemplo*, Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)); y utilizando dímeros de Fv de cadena única (scFv) (véase, *por ejemplo*, Gruber et al. *J. Immunol.* 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos según se describe, *por ejemplo*, en Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos sometidos a ingeniería con tres o más sitios de unión al antígeno funcionales, incluyendo a los “Anticuerpos pulpo”, también están incluidos en la presente (véase, *por ejemplo*, US 2006/0025576). El anticuerpo en la presente también incluye un “FAb de Doble Acción” o “DAF”, que comprende un sitio de unión al antígeno que se une a SIRPA múltiple (véase, US 2008/0069820, *por ejemplo*).

Variantes de Anticuerpos

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente, se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo.

Variantes de Sustitución, Inserción, y Supresión

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse mediante la introducción de modificaciones apropiadas dentro de la secuencia de nucleótidos que codifican el anticuerpo, o a través de síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, las supresiones desde, y/o las inserciones dentro de y/o las sustituciones de los residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. **TABLA 1:** Sustituciones de Aminoácidos

Residuo Original	Sustituciones Ejemplificativas	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu

Residuo Original	Sustituciones Ejemplificativas	Sustituciones Preferidas
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran a través de la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la columna vertebral del polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio blanco, o (c) el grueso de la cadena lateral. Los residuos que se producen de forma natural se dividen en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrofóbica: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofóbica neutra: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácida: Asp, Glu;
- (4) de base: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- (6) aromática: Trp, Tyr, Phe.

Por ejemplo, las sustituciones no conservadoras pueden involucrar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Dichos residuos sustituidos pueden ser introducidos, por ejemplo, dentro de regiones de un anticuerpo humano que son homólogas con anticuerpos no humanos, o dentro de regiones no homólogas de la molécula.

Para efectuar los cambios al polipéptido o anticuerpo descrito en la presente, de acuerdo con ciertas realizaciones, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de sus características de carga e hidrofobicidad. Ellas son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

La importancia del índice hidropático de los aminoácidos en conferir una función biológica interactiva sobre una proteína se comprende en la técnica. Kyte et al. *J. Mol. Biol.*, 157:105-131 (1982). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen un puntaje o índice hidropático similar y que aún mantienen una actividad biológica similar. Para efectuar los cambios en base al índice hidropático, en ciertas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos se encuentran dentro de ± 2 . En ciertas realizaciones, se incluyen aquéllos que se encuentran dentro de ± 1 , y en ciertas realizaciones, se incluyen aquéllos dentro de $\pm 0,5$.

También se comprende en la técnica que la sustitución de como aminoácidos puede llevarse a cabo de modo efectivo en base a la hidrofiliidad, particularmente donde la proteína o péptido biológicamente funcional creado de este modo se destina para utilizar en realizaciones inmunológicas, como en el presente caso. En ciertas realizaciones, el mayor promedio local de hidrofiliidad de una proteína, como gobernado por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Los siguientes valores de hidrofili­cidad han sido asignados a estos residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0±1); aspartato (+3,0±1); glutamato (+3,0±1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (−0,4); prolina (−0,5±1); alanina (−0,5); histidina (−0,5); cisteína (−1,0); metionina (−1,3); valina (−1,5); leucina (−1,8); isoleucina (−1,8); tirosina (−2,3); fenilalanina (−2,5) y triptófano (−3,4). Para efectuar los cambios en base a valores de hidrofili­cidad similares, en ciertas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofili­cidad se encuentran dentro de ±2, en ciertas realizaciones, se incluyen aquéllos que se encuentran dentro de ±1, y en ciertas realizaciones, se incluyen aquéllos dentro de ±0,5. Uno puede también identificar epítomos a partir de secuencias de aminoácidos primarias sobre la base de la hidrofili­cidad. A estas regiones también se hace referencia como “regiones epitópicas del núcleo”.

En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o supresiones pueden tener lugar dentro de una o más HVRs siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden efectuarse en HVRs alteraciones conservadoras (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras según se proporciona en la presente) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión. Dichas alteraciones pueden, por ejemplo, ser fuera de los residuos que contactan antígenos en las HVRs. En ciertas realizaciones de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR o bien está inalterada, o bien contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen a las fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que tienen un rango en longitud desde un residuo a polipéptidos que comprenden cien o más residuos, así como también inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Los

ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionil N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al N- o C-término del anticuerpo a una enzima (*por ejemplo*, para ADEPT) o a un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

También puede ser sustituido cualquier residuo de cisteína no involucrado en mantener la conformación apropiada del anticuerpo, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir el entrecruzamiento aberrante. A la inversa, pueden adicionarse enlace(s) de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

Variantes de glucosilación

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente, el anticuerpo es alterado para aumentar o disminuir la extensión hasta la cual el anticuerpo es glucosilado. La adición o supresión de sitios de glucosilación a un anticuerpo puede lograrse de modo conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de modo tal que se cree o elimine uno o más sitios de glucosilación.

La glucosilación de anticuerpos es típicamente o bien unida a N o bien unida a O. Unida a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un potencial sitio de glucosilación. La glucosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido,

más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden utilizarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se logra de modo conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de modo tal que ésta contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación unidos a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación unidos a O).

Donde el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido al mismo puede ser alterado. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamíferos típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico, ramificado que está generalmente unido por un enlace N a Asn297 de acuerdo con la numeración de Kabat del dominio CH2 de la región Fc. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa, y ácido siálico, así como también una fucosa unida a una GlcNAc en el “tallo” de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, pueden efectuarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención con el objeto de crear variantes de anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas.

En una realización, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directamente o indirectamente) a una región Fc. Véase, *por ejemplo*, las Publicaciones de Patentes de Estados Unidos Nos. 2003/0157108 y 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos “defucosilados” o “deficientes en fucosa” incluyen: US 2003/0157108; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Bioing. Biotech.* 87:614 (2004). Los ejemplos de

líneas celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen a las células Led 3 CHO deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka et al. *Bioquím. Biofis. Arq.* 249:533-545 (1986); US 2003/0157108), y a las líneas celulares desactivadas, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO desactivadas (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. *Bioing. Biotec.* 87: 614 (2004) y Kanda et al. *Bioing. Biotechnol.* 94(4):680-688 (2006)).

Regiones Constantes Modificadas

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos anti-SIRPA proporcionados en la presente, el anticuerpo Fc es isotipos y/o modificaciones de un anticuerpo Fc. En algunas realizaciones, el isotipo y/o modificación del anticuerpo Fc es capaz de unirse a un receptor Fc gamma.

Los isotipos y modificaciones del anticuerpo Fc ejemplificativos se proporcionan en la **Tabla 2** a continuación. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación es capaz de unirse a un receptor Fc gamma que tiene un isotipo de Fc enumerado en la **Tabla 2** a continuación.

Tabla 2: Isotipos de Fc de anticuerpo anti-SIRPA ejemplificativos que son capaces de unirse al receptor Fc gamma

Isotipo de Fc	Mutación (Esquema de numeración EU)
IgG1	N297A
IgG1	D265A y N297A
IgG1	D270A
IgG1	L234A y L235A
	L234A y G237A

Isotipo de Fc	Mutación (Esquema de numeración EU)
	L234A y L235A y G237A
IgG1	D270A, y/o P238D, y/o L328E, y/o E233D, y/o G237D y/o H268D, y/o P271G, y/o A330R
IgG1	P238D y L328E y E233D y G237D y H268D y P271G y A330R
IgG1	P238D y L328E y G237D y H268D y P271G y A330R
IgG1	P238D y S267E y L328F y E233D y G237D y H268D y P271G y A330R
IgG1	P238D y S267E y L328F y G237D y H268D y P271G y A330R
IgG2	V234A y G237A
IgG4	L235A y G237A y E318A
IgG4	S228P y L236E
IgG2/4 híbrido	IgG2 aa 118 a 260 y IgG4 aa 261 a 447
	H268Q y V309L; y A330S y P331S
IgG1	C226S y C229S y E233P y L234V y L235A
IgG1	L234F y L235E y P331S
IgG2	C232S o C233S
IgG2	A330S y P331S
IgG1	S267E y L328F S267E solo
IgG2	S267E y L328F
IgG4	S267E y L328F
IgG2	WT HC con Kappa (cadena ligera) LC HC C127S con Kappa LC Kappa LC C214S

Isotipo de Fc	Mutación (Esquema de numeración EU)
	Kappa LC C214S y HC C233S Kappa LC C214S y HC C232S Cualquiera de las mutaciones enumeradas anteriormente conjuntamente con las mutaciones P330S y P331S Fragmento F(ab')₂ de WT IgG1 y cualquiera de las mutaciones enumeradas anteriormente
IgG1	Substituir la región bisagra y Constante Pesada 1 (CH1) de IgG1 Con CH1 y la región bisagra de IGg2 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDPHKPS NTKVDKTVR KCCVECPCP (SEQ ID NO: 58) Con un Kappa LC
IgG1	Cualquiera de las mutaciones enumeradas anteriormente conjuntamente con A330L/A330S y/o L234F y/o L235E y/o P331S
IgG1, IgG2, o IgG4	Cualquiera de las mutaciones enumeradas anteriormente conjuntamente con M252Y y/o S254T y/o T256E
IgG1 de ratón, IgG2a de ratón, IgG2b de ratón	Para modelos de enfermedades en ratones
IgG4	WT
IgG1	Cualquiera de las mutaciones enumeradas anteriormente conjuntamente con E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, S440W y/o cualquier

Isotipo de Fc	Mutación (Esquema de numeración EU)
	combinación de las mismas.
IgG2	Cualquiera de las mutaciones enumeradas anteriormente conjuntamente con E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, S440W y/o cualquier combinación de las mismas.

Además de los isotipos descritos en la Tabla 2, y sin desear estar limitados por la teoría, se cree que los anticuerpos con isotipos de IgG1 o IgG3 humana y los mutantes de los mismos (*por ejemplo* Strohl (2009) Opinión Actual en Biotecnología 2009, 20:685–691) que se unen a los Receptores Fcγ I, IIA, IIC, IIIA, IIIB en humanos y/o a los Receptores Fcγ I, III y IV en ratones, también pueden actuar como anticuerpos agonistas transitorios.

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma es de la clase IgG, de la clase IgM, o de la clase IgA. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma tiene un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una o más (*por ejemplo*, una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, o todas las trece) sustituciones de aminoácidos en la región Fc en una posición de residuo seleccionada del grupo integrado por: C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y en cualquier combinación (posición de residuo de acuerdo con la numeración EU o Kabat). En algunas realizaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos en la posición E430G. En algunas realizaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones L243A, L235A, y P331A. En algunas realizaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las

posiciones L243A, L235A, P331A. En algunas realizaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones K322A y E430G. En algunas realizaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones P331S y E430G. En algunas realizaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones A330S, P331S, y E430G. En algunas realizaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones K322A, A330S, y P331S. En algunas realizaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones K322A, P331S, y E430G. En algunas realizaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones A330S, P331S, y E430G. En algunas realizaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones S267E y L328F. En algunas realizaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos en la posición C127S. En algunas realizaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E345R, E430G y S440Y

En ciertas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma tiene un isotipo de IgG2. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma contiene una región constante de IgG2 humana. En algunas realizaciones, la región constante de IgG2 humana incluye una región Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma se une a un receptor Fc inhibidor. En ciertas realizaciones, el receptor Fc inhibidor es el receptor Fc gamma IIB inhibidor (FcγIIB). En algunas realizaciones, la región Fc contiene una o más modificaciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la región Fc contiene una o más sustituciones de aminoácidos (*por ejemplo*, en relación con una región Fc de tipo salvaje del mismo isotipo). En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos están seleccionadas de V234A (Alegre et al., (1994) *Transplante* 57:1537-1543. 31; Xu et al., (2000)

Inmunol Cel, 200:16-26), G237A (Cole et al. (1999) *Transplante*, 68:563-571), H268Q, V309L, A330S, P331S (US 2007/0148167; Armour et al. (1999) *Eur J Immunol* 29: 2613-2624; Armour et al. (2000) *El Diario de Hematología* 1(Suppl.1):27; Armour et al. (2000) *El Diario de Hematología* 1(Suppl.1):27), C232S, y/o C233S (White et al.(2015) *Células Cancerígenas* 27, 138–148), S267E, L328F (Chu et al., (2008) *Inmunol Mol*, 45:3926-3933), M252Y, S254T, y/o T256E, donde la posición de los aminoácidos es de acuerdo con la convención de numeración EU o Kabat.

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma tiene un isotipo de IgG2 con un dominio constante de cadena pesada que contiene una sustitución de aminoácidos C127S, donde la posición de los aminoácidos es de acuerdo con la convención de numeración EU o Kabat (White et al., (2015) *Células Cancerígenas* 27, 138-148; Lightle et al., (2010) *CIENCIA DE LAS PROTEÍNAS* 19:753-762; y WO2008079246).

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma tiene un isotipo de IgG2 con un dominio constante de cadena ligera de Kappa que contiene una sustitución de aminoácidos, donde la posición de los aminoácidos es de acuerdo con la convención de numeración EU o Kabat (White et al., (2015) *Células Cancerígenas* 27, 138-148; Lightle et al., (2010) *CIENCIA DE LAS PROTEÍNAS* 19:753-762; y WO2008079246).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma tiene un isotipo de IgG1. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma contiene una región constante de IgG1 de ratón. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma contiene una región constante de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la región constante de IgG1 humana incluye una región Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma se une a un receptor Fc inhibidor. En ciertas realizaciones,

el receptor Fc inhibidor es el receptor Fc gamma IIB inhibidor (FcγIIB). En algunas realizaciones, la región Fc contiene una o más modificaciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la región Fc contiene una o más sustituciones de aminoácidos (*por ejemplo*, en relación con una región Fc de tipo salvaje del mismo isotipo). En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos están seleccionadas de N297A (Bolt S et al. (1993) *Eur J Immunol* 23:403-411), D265A (Shields et al. (2001) *R. J. Biol. Chem.* 276, 6591–6604), D270A, L234A, L235A (Hutchins et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos*, 92:11980-11984; Alegre et al., (1994) *Transplante* 57:1537-1543. 31; Xu et al., (2000) *Inmunol Cel*, 200:16-26), G237A (Alegre et al. (1994) *Transplante* 57:1537-1543. 31; Xu et al. (2000) *Inmunol Cel*, 200:16-26), P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E (McEarchern et al., (2007) *Sangre*, 109:1185-1192), P331S (Sazinsky et al., (2008) *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos* 2008, 105:20167-20172), S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, y/o T394D, donde la posición de los aminoácidos es de acuerdo con la convención de numeración EU o Kabat.

En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye una región bisagra y un dominio constante de cadena pesada 1 (CH1) de isotipo de IgG2 (White et al., (2015) *Células Cancerígenas* 27, 138–148). En ciertas realizaciones, la región bisagra y el CH1 de isotipo IgG2 contienen la secuencia de aminoácidos ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVKDKTVERKCCVECPPCP (SEQ ID NO:58). En algunas realizaciones, la región de anticuerpo Fc contiene una sustitución de aminoácidos S267E, una sustitución de aminoácidos L328F, o ambas, y/o una sustitución de aminoácidos N297A o N297Q, donde la

posición de los aminoácidos es de acuerdo con la convención de numeración EU o Kabat.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma tiene un isotipo de IgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma contiene una región constante de IgG4 humana. En algunas realizaciones, la región constante de IgG4 humana incluye una región Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma se une a un receptor Fc inhibidor. En ciertas realizaciones, el receptor Fc inhibidor es el receptor Fc gamma IIB inhibidor (FcγIIB). En algunas realizaciones, la región Fc contiene una o más modificaciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la región Fc contiene una o más sustituciones de aminoácidos (*por ejemplo*, en relación con una región Fc de tipo salvaje del mismo isotipo). En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos están seleccionadas de L235A, G237A, S228P, L236E (Reddy et al., (2000) *J Immunol*, 164:1925-1933), S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, y/o T256E, donde la posición de los aminoácidos es de acuerdo con la convención de numeración EU o Kabat.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma tiene un isotipo de IgG2/4 híbrido. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al receptor Fc gamma incluye una secuencia de aminoácidos que contiene los aminoácidos 118 a 260 de acuerdo con la numeración EU o Kabat de IgG2 humana y los aminoácidos 261-447 de acuerdo con la numeración EU o Kabat de IgG4 humana (WO 1997/11971; WO 2007/106585).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo contiene una región constante de IgG4 de ratón (Bartholomaeus, et al. (2014). *J. Immunol.* 192, 2091–2098).

En algunas realizaciones, la región Fc contiene además una o más sustituciones adicionales de aminoácidos seleccionadas de A330L, L234F;

L235E, y P331S de acuerdo con la numeración de EU o Kabat; y cualquier combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo contiene una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc a una posición de residuo seleccionada de C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y, y cualquier combinación de las mismas, donde la numeración de los residuos es de acuerdo con la numeración EU o Kabat. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, L243A, L235A, y P331S, donde la numeración de la posición del residuo es de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G y P331S, donde la numeración de la posición del residuo es de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G y K322A, donde la numeración de la posición del residuo es de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, A330S, y P331S, donde la numeración de la posición del residuo es de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, K322A, A330S, y P331S, donde la numeración de la posición del residuo es de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, K322A, y A330S, donde la numeración de la posición del residuo es de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, K322A, y P331S, donde la numeración de la posición del residuo es de acuerdo con la numeración de EU. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una sustitución de aminoácidos en las posiciones S267E y

L328F, donde la numeración de la posición del residuo es de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una sustitución de aminoácidos en la posición C127S, donde la numeración de la posición del residuo es de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una sustitución de aminoácidos en las posiciones E345R, E430G y S440Y, donde la numeración de la posición del residuo es de acuerdo con la numeración EU.

En algunas realizaciones, los anticuerpos que se unen a una proteína de SIRPA pueden incluir anticuerpos que reducen los niveles celulares de SIRPA (*por ejemplo*, los niveles de la superficie celular de SIRPA), inhiben la interacción (*por ejemplo*, la unión) entre SIRPA y/o uno o más ligandos de SIRPA, e inhiben una o más actividades de una proteína de SIRPA. Dichos anticuerpos inhiben una o más actividades de una proteína de SIRPA ya sea al prevenir la interacción (*por ejemplo*, la unión) entre SIRPA y uno o más ligandos de SIRPA o al prevenir la transducción de señal desde el dominio extracelular de SIRPA dentro del citoplasma celular en presencia de uno o más ligandos de SIRPA. Los anticuerpos también pueden inhibir una o más actividades de una proteína de SIRPA mediante la disminución de los niveles de superficie celular de SIRPA mediante la inducción de la degradación de SIRPA, la desensibilización de SIRPA, la escisión de SIRPA, la internalización de SIRPA, el desprendimiento de SIRPA, la regulación hacia abajo de la expresión de SIRPA, y/o la degradación lisosómica de SIRPA. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos anti-SIRPA pueden no activar transitoriamente a SIRPA.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación pueden tener la especificidad de epítipo de un anticuerpo anti-SIRPA agonista transitorio de la presente divulgación pero tienen un dominio Fc que no

es capaz de unirse a los receptores Fcγ y de este modo es incapaz de, por ejemplo, agrupar y activar transitoriamente a SIRPA.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación tienen, sin limitación, una o más de las siguientes actividades: la capacidad para disminuir la unión de una proteína de SIRPA a uno o más ligandos de SIRPA, tales como glucolípidos que contienen ácido siálico o glicoproteínas que contienen ácido siálico, la capacidad para disminuir la unión de un supresor de proteína de señalización de citoquinas (SOCS) (*por ejemplo*, la proteína SOCS3) a una proteína de SIRPA, la capacidad para aumentar la degradación proteasomal de una proteína de SIRPA, la capacidad para reducir la expresión funcional de SIRPA sobre la superficie de las células dendríticas, macrófagos, monocitos, células T, y/o microglía circulantes, la capacidad para disminuir la fosforilación de Tyr-340 y Tyr-358 a través de una tirosina quinasa de familia Src tal como LCK y FYN, la capacidad para disminuir el reclutamiento de y la unión a las tirosina fosfatasa de proteína específica SHP1 y SHP2, la capacidad para disminuir el reclutamiento de y la unión a PLC-γ1, que actúa como un nucleótido de guanina, factor de intercambio para Dynamin-1, la capacidad para disminuir el reclutamiento de y la unión a Crkl, la capacidad para disminuir el reclutamiento de y la unión a la bazo tirosina quinasa Syk, la capacidad para disminuir el reclutamiento de y la unión a la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb2) de SH3-SH2-SH3, la capacidad para disminuir el reclutamiento de y la unión a múltiples proteínas que contienen SH2, la capacidad para aumentar la movilización de calcio intracelular, la capacidad para modular la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1β, IL-8, y TNF-α, la capacidad para disminuir la activación de fosfoinositida 3-quinasa, la capacidad para aumentar el crecimiento de monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, y/o microglía, la capacidad para aumentar la supervivencia de monocitos,

macrófagos, células dendríticas, células T, y/o microglía, la capacidad para aumentar la fosforilación de tirosina sobre múltiples proteínas celulares, la capacidad para aumentar la actividad fagocítica de monocitos, macrófagos, células dendríticas y/o microglía, la capacidad para aumentar la proliferación celular de monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, y/o microglía, la capacidad para aumentar la fosforilación de moléculas de señalización que median la señalización de ITAM, la capacidad para aumentar la función de los receptores de reconocimiento de patrones, la capacidad para aumentar la función de los receptores tipo Toll, la capacidad para aumentar la función de los receptores de patrón molecular asociado a daño (DAMP), la capacidad para modular la expresión del receptor 7 de quimiocina C-C (CCR7), y la capacidad para aumentar la eliminación de desechos de proteínas y celulares.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación tienen una región Fc que despliega una unión reducida a uno o más receptores Fcγ. Los ejemplos de dichas modificaciones y regiones Fc se proporcionan en la Tabla 3 a continuación. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene un isotipo de Fc enumerado en la Tabla 3 a continuación.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación con unión reducida a los receptores Fc gamma tienen un isotipo de Fc enumerado en la **Tabla 3** a continuación.

Tabla 3: Isotipos de Fc de anticuerpo anti-SIRPA con unión reducida al receptor Fc gamma ejemplificativos

Isotipo de Fc	Mutación (Esquema de numeración EU)
IgG1	N297A o N297Q y/o D270A
IgG1	D265A, D270A, y/o N297A

Isotipo de Fc	Mutación (Esquema de numeración EU)
IgG1	L234A y L235A
IgG2	V234A y G237A
IgG4	F235A y G237A y E318A E233P y/o F234V N297Ao N297Q
IgG4	S228P y L236E S241P S241P y L248E S228P y F234A y L235A
IgG2	H268Q y V309L y A330S y P331S
IgG1	C220S y C226S y C229S y P238S
IgG1	C226S y C229S y E233P y L234V, y L235A
IgG1	E233P y L234V y L235A y G236-eliminado P238A D265A N297A A327Q o A327G P329A
IgG1	K322A y L234A y L235A
IgG1	L234Fy L235E y P331S
IgG1 o IgG4	T394D
IgG2	C232S o C233S N297Ao N297Q
IgG2	V234A y G237A y P238S y H268A y V309L y A330S y P331S
IgG1, IgG2, o IgG4	modificaciones delta a, b, c, ab, ac, g

Isotipo de Fc	Mutación (Esquema de numeración EU)
IgG1	Cualquiera de las mutaciones enumeradas anteriormente conjuntamente con A330L o L234F y/o L235E y/o P331S
IgG1, IgG2, o IgG4	Cualquiera de las mutaciones enumeradas anteriormente conjuntamente con M252Y y/o S254T y/o T256E

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA tiene un isotipo de IgG1. En algunas realizaciones, el anticuerpo contiene una región constante de IgG1 de ratón. En algunas realizaciones, el anticuerpo contiene una región constante de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la región constante de IgG1 humana incluye una región Fc. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una o más modificaciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la región Fc contiene una o más sustituciones de aminoácidos (*por ejemplo*, en relación con una región Fc de tipo salvaje del mismo isotipo).

En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos están seleccionadas de N297A, N297Q (Bolt S et al. (1993) *Eur J Immunol* 23:403-411), D265A, D270A, L234A, L235A (McEarchern et al., (2007) *Sangre*, 109:1185-1192), C226S, C229S (McEarchern et al., (2007) *Sangre*, 109:1185-1192), P238S (Davis et al., (2007) *J Rheumatol*, 34:2204-2210), E233P, L234V (McEarchern et al., (2007) *Sangre*, 109:1185-1192), P238A, A327Q, A327G, P329A (Shields RL, et al., (2001) *J Quím Biol*. 276(9):6591-604), K322A, L234F, L235E (Hezareh, et al., (2001) *J Virol* 75, 12161–12168; Oganessian et al., (2008). *Acta Crystallográfica* 64, 700–704), P331S (Oganessian et al., (2008) *Acta Crystallográfica* 64, 700–704), T394D (Wilkinson et al. (2013) *MAbs* 5(3): 406–417), A330L, M252Y, S254T, y/o T256E, donde la posición de los aminoácidos es de acuerdo con la convención de numeración EU o Kabat. En ciertas realizaciones, la región Fc incluye además una eliminación de aminoácidos en una posición que corresponde a la glicina 236 de acuerdo con la convención de numeración EU o Kabat.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA tiene un isotipo de IgG1 con una región constante de cadena pesada que contiene una sustitución de aminoácidos C220S de acuerdo con la convención de numeración EU o Kabat. En algunas realizaciones, la región Fc contiene además una o más sustituciones adicionales de aminoácidos seleccionadas de A330L, L234F; L235E, y/o P331S de acuerdo con la convención de numeración EU o Kabat. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA tiene un isotipo de IgG2. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA contiene una región constante de IgG2 humana. En algunas realizaciones, la región constante de IgG2 humana incluye una región Fc. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una o más modificaciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la región Fc contiene una o más sustituciones de aminoácidos (*por ejemplo*, en relación con una región Fc de tipo salvaje del mismo isotipo). En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos están seleccionadas de P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, H268E, V309L, N297A, N297Q, V309L, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, y/o T256E, donde la posición de los aminoácidos es de acuerdo con la convención de numeración EU o Kabat (Vafa O. et al., (2014) *Métodos* 65:114–126).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA tiene un isotipo de IgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-SIRPA contiene una región constante de IgG4 humana. En algunas realizaciones, la región constante de IgG4 humana incluye una región Fc. En algunas realizaciones, la región Fc contiene una o más modificaciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la región Fc contiene una o más sustituciones de aminoácidos (*por ejemplo*, en relación con una región Fc de tipo salvaje del mismo isotipo). En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos están seleccionadas de E233P, F234V, L235A, G237A, E318A (Hutchins et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos*,

92:11980-11984), S228P, L234A/F234A, L236E, S241P, L248E (Reddy et al., (2000) *J Immunol*, 164:1925-1933; Angal et al., (1993) *Immunol. Mol* 30(1):105-8; US 8614299 B2; Vafa O. et al., (2014) *Métodos* 65:114–126), T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, y/o N297Q, donde la posición de los aminoácidos es de acuerdo con la convención de numeración EU o Kabat. En algunas realizaciones el anticuerpo tiene un isotipo de IgG4, y comprende una sustitución de aminoácidos S228P en la posición de residuo 228, una sustitución de aminoácidos F234A en la posición de residuo 234, y una sustitución de aminoácidos L235A en la posición de residuo 235 (posición de residuo de acuerdo con la numeración EU).

En algunas realizaciones, la región Fc contiene además una o más sustituciones adicionales de aminoácidos seleccionadas de a M252Y, S254T, y/o T256E, donde la posición de los aminoácidos es de acuerdo con la convención de numeración EU o Kabat.

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente, el anticuerpo Fc modificado es un Fc modificado de IgG1. En algunas realizaciones, el Fc modificado de IgG1 comprende una o más modificaciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, Fc modificado de IgG1 comprende una o más sustituciones de aminoácidos (*por ejemplo*, en relación con una región Fc de tipo salvaje del mismo isotipo). En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos están seleccionadas de N297A (Bolt S et al. (1993) *Eur J Immunol* 23:403-411), D265A (Shields et al. (2001) *R. J. Quím. Biol.* 276, 6591–6604), L234A, L235A (Hutchins et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos*, 92:11980-11984; Alegre et al., (1994) *Transplante* 57:1537-1543. 31; Xu et al., (2000) *Immunol Cel*, 200:16-26), G237A (Alegre et al. (1994) *Transplante* 57:1537-1543. 31; Xu et al. (2000) *Immunol Cel*, 200:16-26), C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E (McEarchern et al., (2007) *Sangre*,

109:1185-1192), P331S (Sazinsky et al., (2008) *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos* 2008, 105:20167-20172), S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, y/o T256E, donde la posición de los aminoácidos es de acuerdo con la numeración de la convención EU.

En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende mutación N297A de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende mutaciones D265A y N297A de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende mutaciones D270A de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, el Fc modificado de IgG1 comprende mutaciones L234A y L235A de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende mutaciones L234A y G237A de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende mutaciones L234A, L235A y G237A de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende una o más (incluyendo todas) de mutaciones P238D, L328E, E233, G237D, H268D, P271G y A330R de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende una o más de mutaciones S267E/L328F de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende mutaciones P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G y A330R de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende mutaciones P238D, L328E, G237D, H268D, P271G y A330R de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende mutaciones P238D, S267E, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G y A330R de

acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende mutaciones P238D, S267E, L328E, G237D, H268D, P271G y A330R de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende mutaciones C226S, C229S, E233P, L234V, y L235A de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende mutaciones L234F, L235E, y P331S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende mutaciones S267E y L328F de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende mutaciones S267E de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc comprende un sustituto de una región bisagra y la constante pesada 1 (CH1) de IgG1 con CH1 y una región bisagra de IgG2 (aminoácidos 118-230 de IgG2 de acuerdo con la numeración EU) con una Cadena ligera Kappa.

En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc incluye dos o más sustituciones de aminoácidos que aumentan el agrupamiento de anticuerpos sin activar el complemento según se compara con un correspondiente anticuerpo que tiene una región Fc que no incluye las dos o más sustituciones de aminoácidos. En consecuencia, en algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc modificado de IgG1 es un anticuerpo que comprende una región Fc, donde el anticuerpo comprende una sustitución de aminoácidos en la posición E430G y una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc a una posición de residuo seleccionada de: L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, y cualquier combinación de los mismos de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, el Fc modificado de IgG1 comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G,

L243A, L235A, y P331S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, el Fc modificado de IgG1 comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G y P331S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, el Fc modificado de IgG1 comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G y K322A de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, el Fc modificado de IgG1 comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, A330S, y P331S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, el Fc modificado de IgG1 comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, K322A, A330S, y P331S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, el Fc modificado de IgG1 comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, K322A, y A330S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, el Fc modificado de IgG1 comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, K322A, y P331S de acuerdo con la numeración EU.

En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc modificado de IgG1 puede comprender además en la presente puede combinarse con una Mutación A330L (Lazar et al. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos*, 103:4005-4010 (2006)), o una o más de mutaciones L234F, L235E, y/o P331S (Sazinsky et al. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos*, 105:20167-20172 (2008)), de acuerdo con la numeración de la convención EU, para eliminar la activación del complemento. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc modificado de IgG1 puede comprender además una o más de A330L, A330S, L234F, L235E, y/o P331S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc modificado de IgG1 puede comprender además una o más mutaciones para mejorar la vida media del anticuerpo en suero humano (*por ejemplo*, una o más (incluyendo todas) de

mutaciones M252Y, S254T, y T256E de acuerdo con la convención de numeración EU). En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1, el Fc modificado de IgG1 puede comprender además una o más de E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, y/o S440W de acuerdo con la numeración EU.

Otros aspectos de la presente divulgación se relacionan con anticuerpos que tienen regiones constantes (es decir, regiones Fc) modificadas. Un anticuerpo dependiente de la unión al receptor FcγR para activar receptores focalizados puede perder su actividad agonista si se somete a ingeniería para eliminar la unión a FcγR (véase, por ejemplo, Wilson et al. *Células Cancerígenas* 19:101-113 (2011); Armour et al. *Inmunología* 40:585-593 (2003); y White et al. *Células Cancerígenas* 27:138-148 (2015)). Como tal, se piensa que un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación con la correcta especificidad de epítipo puede activar al antígeno objetivo, con mínimos efectos adversos, cuando el anticuerpo tiene un dominio Fc a partir de un isotipo de IgG2 humana (CH1 y región bisagra) u otro tipo de dominio Fc que es capaz de unirse con preferencia a los receptores inhibidores FcγRIIB r, o una variación de los mismos.

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente, el anticuerpo Fc modificado es un Fc modificado de IgG2. En algunas realizaciones, el Fc modificado de IgG2 comprende una o más modificaciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el Fc modificado de IgG2 comprende una o más sustituciones de aminoácidos (*por ejemplo*, en relación con una región Fc de tipo salvaje del mismo isotipo). En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, la una o más sustituciones de aminoácidos están seleccionadas de V234A (Alegre et al. *Trasplante* 57:1537-1543 (1994); Xu et al. *Inmunol Cel*, 200:16-26 (2000)); G237A (Cole et al. *Trasplante*, 68:563-571 (1999)); H268Q, V309L, A330S, P331S (US 2007/0148167; Armour et al. *Eur J*

Inmunol 29: 2613-2624 (1999); Armour et al. *El Diario de Hematología* 1(Suppl.1):27 (2000); Armour et al. *El Diario de Hematología* 1(Suppl.1):27 (2000)), C219S, y/o C220S (White et al. *Células Cancerígenas* 27, 138-148 (2015)); S267E, L328F (Chu et al. *Inmunol Mol*, 45:3926-3933 (2008)); y M252Y, S254T, y/o T256E de acuerdo con la numeración de la convención EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones V234A y G237A de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones C219S o C220S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones A330S y P331S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones S267E y L328F de acuerdo con la numeración EU.

En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos C127S de acuerdo con la numeración de la convención EU (White et al., (2015) *Células Cancerígenas* 27, 138-148; Lightle et al. *Protein Sci.* 19:753-762 (2010); y WO 2008/079246). En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, el anticuerpo tiene un isotipo de IgG2 con un dominio constante de cadena ligera de Kappa que comprende una sustitución de aminoácidos C214S de acuerdo con la numeración de la convención EU (White et al. *Células Cancerígenas* 27:138-148 (2015); Lightle et al. *Cien. Proteínas* 19:753-762 (2010); y WO 2008/079246).

En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos C220S de acuerdo con la numeración de la convención EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado

de IgG2, el anticuerpo tiene un isotipo de IgG2 con un dominio constante de cadena ligera de Kappa que comprende una sustitución de aminoácidos C214S de acuerdo con la numeración de la convención EU.

En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos C219S de acuerdo con la numeración de la convención EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, el anticuerpo tiene un isotipo de IgG2 con un dominio constante de cadena ligera de Kappa que comprende una sustitución de aminoácidos C214S de acuerdo con la numeración de la convención EU.

En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, el Fc incluye un dominio constante de cadena pesada 1 (CH1) de isotipo de IgG2 y una región bisagra (White et al. *Células Cancerígenas* 27:138-148 (2015)). En ciertas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, la región bisagra y el CH1 de isotipo de IgG2 comprenden la secuencia de aminoácidos 118-230 de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, la región de anticuerpo Fc comprende una sustitución de aminoácidos S267E, una sustitución de aminoácidos L328F, o ambas, y/o una sustitución de aminoácidos N297A o N297Q de acuerdo con la numeración de la convención EU.

En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, el Fc comprende además una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, y S440W de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, el Fc puede comprender además una o más mutaciones para mejorar la vida media del anticuerpo en suero humano (*por ejemplo*, una o más (incluyendo todas) de mutaciones mutaciones M252Y, S254T, y T256E de acuerdo con la numeración de la convención EU). En algunas realizaciones de

cualquiera del Fc modificado de IgG2, el Fc puede comprender además A330S y P331S.

En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG2, el Fc es un Fc híbrido de IgG2/4. En algunas realizaciones, el Fc híbrido de IgG2/4 comprende IgG2 aa 118 a 260 y IgG4 aa 261 a 447. En algunas realizaciones de cualquier Fc modificado de IgG2, el Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones H268Q, V309L, A330S, y P331S de acuerdo con la numeración EU.

En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1 y/o de IgG2, el Fc comprende una o más sustituciones adicionales de aminoácidos seleccionadas de A330L, L234F; L235E, o P331S de acuerdo con la numeración EU; y cualquier combinación de las mismas.

En ciertas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1 y/o de IgG2, el Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos a una posición de residuo seleccionadas de C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y, y cualquier combinación de las mismas de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1 y/o de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, L243A, L235A, y P331S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1 y/o de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G y P331S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1 y/o de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G y K322A de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1 y/o de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, A330S, y P331S de acuerdo con la numeración EU. En

algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1 y/o de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, K322A, A330S, y P331S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1 y/o de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, K322A, y A330S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1 y/o de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, K322A, y P331S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1 y/o de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones S267E y L328F de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1 y/o de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en la posición C127S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG1 y/o de IgG2, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E345R, E430G y S440Y de acuerdo con la numeración EU.

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente, el anticuerpo Fc modificado es un Fc modificado de IgG4. En algunas realizaciones, el Fc modificado de IgG4 comprende una o más modificaciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el Fc modificado de IgG4 comprende una o más sustituciones de aminoácidos (*por ejemplo*, en relación con una región Fc de tipo salvaje del mismo isotipo). En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, la una o más sustituciones de aminoácidos están seleccionadas de L235A, G237A, S229P, L236E (Reddy et al. *J Immunol* 164:1925-1933(2000)), S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, y/o T256E de acuerdo con la numeración de la convención EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, el Fc puede comprender además L235A,

G237A, y E318A de acuerdo con la numeración de la convención EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, el Fc puede comprender además S228P y L235E de acuerdo con la numeración de la convención EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, el Fc modificado de IgG4 puede comprender además S267E y L328F de acuerdo con la numeración de la convención EU.

En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, el Fc modificado de IgG4 comprende puede combinarse con una mutación S228P de acuerdo con la numeración de la convención EU (Angal et al. *Inmunol. Mol* 30:105-108 (1993)) y/o con una o más mutaciones descritas en (Peters et al. *J Quím Biol.* 287(29):24525-33 (2012)) para mejorar la estabilización del anticuerpo.

En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, el Fc modificado de IgG4 puede comprender además una o más mutaciones para mejorar la vida media del anticuerpo en suero humano (*por ejemplo*, una o más (incluyendo todas) de mutaciones M252Y, S254T, y T256E de acuerdo con la numeración de la convención EU).

En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, el Fc comprende L235E de acuerdo con la numeración EU. En ciertas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, el Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos a una posición de residuo seleccionada de C127S, F234A, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, E345R, E430G, S440Y, y cualquier combinación de los mismos, de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, L243A, L235A, y P331S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G y P331S de acuerdo con la numeración EU. En algunas

realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G y K322A de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en la posición E430 de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G y K322A de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones S267E y L328F de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en la posición C127S de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones de cualquiera del Fc modificado de IgG4, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E345R, E430G y S440Y de acuerdo con la numeración EU.

Otras modificaciones de anticuerpos

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo es un derivado. El término “derivado” se refiere a una molécula que incluye una modificación química además de una inserción, supresión, o sustitución de aminoácidos (o de ácidos nucleicos). En ciertas realizaciones, los derivados comprenden modificaciones covalentes, que incluyen, pero no se limitan a, el enlace químico con polímeros, lípidos, u otros restos orgánicos o inorgánicos. En ciertas realizaciones, una proteína de unión a antígeno químicamente modificada puede tener una mayor vida media de circulación que una proteína de unión a antígeno que no está químicamente modificada. En ciertas realizaciones, una proteína de unión a antígeno químicamente modificada puede tener una mejorada capacidad de focalización para las células, tejidos, y/u órganos deseados. En algunas realizaciones, una proteína de unión a antígeno derivada se modifica de

modo covalente para incluir una o más uniones de polímeros solubles en agua, que incluyen, pero no se limitan a, polietilen glicol, polioxietilen glicol, o polipropilen glicol. Véase, *por ejemplo*, la Patente de los Estados Unidos Nos. 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 y 4179337. En ciertas realizaciones, una proteína de unión a antígeno derivada comprende uno o más polímeros, que incluyen, pero no se limitan a, monometoxi-polietilen glicol, dextrano, celulosa, copolímeros de etilen glicol/propilen glicol, carboximetilcelulosa, polivinil pirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli-(N-vinil pirrolidona)-polietilen glicol, homopolímeros de propilen glicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polietoxilados (*por ejemplo*, glicerol) y polivinil alcohol, así como también mezclas de dichos polímeros.

En ciertas realizaciones, un derivado está modificado de modo covalente con subunidades de polietilen glicol (PEG). En ciertas realizaciones, uno o más polímeros solubles en agua están unidos en una o más posiciones específicas, por ejemplo en el término amino, de un derivado. En ciertas realizaciones, uno o más polímeros solubles en agua están unidos de modo aleatorio a una o más cadenas laterales de un derivado. En ciertas realizaciones, se utiliza PEG para mejorar la capacidad terapéutica para una proteína de unión a antígeno. En ciertas realizaciones, se utiliza PEG para mejorar la capacidad terapéutica para un anticuerpo humanizado. Ciertos dichos métodos se abordan, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 6133426, la cual se incorpora por la presente como referencia para cualquier propósito.

Los análogos de péptidos comúnmente se utilizan en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a aquéllas del péptido de plantilla. Estos tipos de compuestos no peptídicos son

denominados “miméticos de péptidos” o “peptidomiméticos.” Fauchere, *J. Adv. Fármaco Res.*, 15:29 (1986); y Evans et al. *J. Quím. Med.*, 30:1229 (1987), los cuales se incorporan en la presente como referencia para cualquier propósito. Dichos compuestos a menudo se desarrollan con el auxilio de modelado molecular computarizado. Los miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles pueden utilizarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico similar. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (*es decir*, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero tiene uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado de: -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-(cis y trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, y -CH₂SO-, a través de métodos muy conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones puede utilizarse la sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (*por ejemplo*, D-lisina en lugar de L-lisina) para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica pueden ser generados a través de métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch *Ann. Rev. Bioquím.*, 61:387 (1992), incorporado en la presente como referencia para cualquier propósito); por ejemplo, mediante la adición de residuos de cisteína interna capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares los cuales ciclan el péptido.

La conjugación de fármacos involucra el acoplamiento de un fármaco o carga útil citotóxicos (anticancerígenos) biológicamente activos a un anticuerpo que específicamente se dirige a ciertos marcadores tumorales (*por ejemplo* un polipéptido que, idealmente, sólo se encuentra en o sobre las células tumorales). Los anticuerpos siguen la pista de estas proteínas hacia abajo en el cuerpo y se

unen por sí mismos a la superficie de las células cancerígenas. La reacción bioquímica entre el anticuerpo y la proteína blanco (antígeno) desencadena una señal en la célula tumoral, la cual luego absorbe o internaliza al anticuerpo conjuntamente con la citotoxina. Luego de que el ADC es internalizado, el fármaco citotóxico se libera y mata el cáncer. Debido a esta focalización, idealmente el fármaco tiene menores efectos colaterales y brinda una ventana terapéutica más amplia que otros agentes quimioterapéuticos. Las técnicas para conjugar anticuerpos divulgadas son conocidas en la materia (*véase, por ejemplo*, Jane de Lartigue OncLive 5 de julio, 2012; ADC Revisión sobre conjugados de anticuerpo-fármaco; y Ducry et al. *Química de Bioconjugados* 21 (1):5-13 (2010).

Marcos de Anticuerpos

Cualquiera de los anticuerpos anti-SIRPA descritos en la presente incluye además un marco (FR). En algunas realizaciones, el marco es un marco de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un anticuerpo (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-SIRPA) comprende HVRs como en cualquiera de las realizaciones anteriores y comprende además un marco humano aceptor, *por ejemplo*, un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano. Los marcos de inmunoglobulina humana pueden ser parte del anticuerpo humano, o un anticuerpo no humano puede ser humanizado reemplazando uno o más marcos endógenos con region(es) marco humanas. Las regiones marco humanas que pueden utilizarse para la humanización incluyen pero no se limitan a: regiones marco seleccionadas utilizando el método de “mejor ajuste” (*véase, por ejemplo*, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (*véase, por ejemplo*, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 89:4285 (1992); y Presta et al. *J. Immunol.*,

151:2623 (1993)); regiones marco maduras humanas (mutadas somáticamente) regiones marco de línea germinal humana (véase, *por ejemplo*, Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)); y regiones marco derivadas de bibliotecas de cribado de FR (véase, *por ejemplo*, Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) y Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende una o más (*por ejemplo*, una o más, dos o más, tres o más, o todas las cuatro) regiones marco seleccionadas de VH FR1, VH FR2, VH FR3, y VH FR4 (como se muestra en la Tabla 9). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende un VH FR1, en donde el VH FR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:25. En algunas realizaciones, y (sic) anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende un VH FR2, en donde el VH FR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende un VH FR3, en donde el VH FR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:27. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende un VH FR4, en donde el VH FR4 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:28. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende un VH FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:25, un VH FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:26, un VH FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:27, y un VH FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:28.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende un VH FR1, un VH FR2, un VH FR3, y VH FR4 del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, o 3F9-25.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena ligera que comprende una o más (*por ejemplo*, una o más, dos o más, tres o más, todas las cuatro) regiones marco seleccionadas de VL FR1, VL FR2, VL FR3, y VL FR4 (como se muestra en la Tabla 9). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena ligera que comprende un VL FR1, en donde el VL FR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:29. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena ligera que comprende un VL FR2, en donde el VL FR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:30. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena ligera que comprende un VL FR3, en donde el VL FR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:31. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena ligera que comprende un VL FR4, en donde el VL FR4 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:32. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena ligera que comprende un VL FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:29, un VL FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:30, un VL FR3 que

comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:31, y un VL FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:32.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena ligera que comprende un VL FR1, un VL FR2, un VL FR3, y VL FR4 del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, o 3F9-25.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende un VH FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:25, un VH FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:26, un VH FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:27, y un VH FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:28, y una región variable de cadena ligera que comprende un VL FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:29, un VL FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:30, un VL FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:31, y un VL FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:32. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende un VH FR1, un VH FR2, un VH FR3, y un VH FR4 del anticuerpo 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12, 3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, o 3F9-25, y una región variable de cadena ligera que comprende un VL FR1, un VL FR2, un VL FR3, y un VL FR4 del anticuerpo 3F9-1, 3F9-2, 3F9-3, 3F9-4, 3F9-5, 3F9-6, 3F9-7, 3F9-8, 3F9-9, 3F9-10, 3F9-11, 3F9-12,

3F9-13, 3F9-14, 3F9-15, 3F9-16, 3F9-17, 3F9-18, 3F9-19, 3F9-20, 3F9-21, 3F9-22, 3F9-23, 3F9-24, o 3F9-25.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:47 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:48 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:49 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:51 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-SIRPA, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:52 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:50.

Ácidos nucleicos, vectores, y células huésped

Los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación pueden producirse utilizando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, según se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4816567. En algunas realizaciones, se proporcionan ácidos nucleicos aislados que tienen una secuencia de nucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación. Dichos ácidos nucleicos pueden codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo anti-SIRPA (*por ejemplo*, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En algunas realizaciones, se proporcionan uno o más vectores (*por ejemplo*, vectores de expresión) que comprenden dichos ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, también se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En algunas realizaciones, la célula huésped comprende (*por ejemplo*, ha sido transducida con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En algunas realizaciones, la célula huésped es eucariótica, *por ejemplo*, una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO) o una célula linfoide (*por ejemplo*, célula Y0, NS0, Sp20). Las células huésped de la presente divulgación también incluyen, sin limitación, células aisladas, células cultivadas *in vitro*, y células cultivadas *ex vivo*.

Se proporcionan métodos de elaboración de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el método incluye el cultivo de una célula huésped de la presente divulgación que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-SIRPA, bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo luego es recuperado a partir de la célula huésped (o del medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-SIRPA se aísla y se inserta dentro de uno o más vectores para promover la clonación y/o expresión en una célula huésped. Dicho ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente utilizando procedimientos convencionales (*por ejemplo*, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Los vectores adecuados que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación, o los fragmentos o polipéptidos de los mismos expresados en la superficie celular polipéptidos (sic) (incluyendo los anticuerpos) descritos en la presente incluyen, sin limitación, vectores de clonación y vectores de expresión. Los vectores de clonación adecuados pueden construirse de acuerdo con técnicas estándar, o pueden seleccionarse de una gran cantidad de vectores de clonación disponibles en la técnica. Mientras que el vector de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped destinada a utilizarse, los vectores de clonación útiles generalmente tienen la capacidad para auto-replicarse, pueden poseer un blanco único para una endonucleasa de restricción particular, y/o pueden portar genes para un marcador que puede utilizarse en la selección de clones que comprenden el vector. Los ejemplos

adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, *por ejemplo*, pUC18, pUC19, Bluescript (*por ejemplo*, pBS SK+) y sus derivados, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADNs del fago, y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28. Éstos y muchos otros vectores de clonación se encuentran disponibles por parte de vendedores comerciales tales como BioRad, Strategene, e Invitrogen.

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen células procarióticas o eucarióticas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación pueden producirse en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glicosilación y la función fectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias (*por ejemplo*, Patentes de los Estados Unidos Nos. 5648237, 5789199, y 5840523. Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse a partir de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede además purificarse.

Además de los procariotas, los microorganismos eucarióticos, tales como levadura u hongos filamentosos, también son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levadura cuyas vías de glicosilación se han “humanizado”, resultando en la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcialmente o completamente humano (*por ejemplo*, Gerngross *Biotec. Nat.* 22:1409-1414 (2004); y Li et al. *Biotec. Nat.* 24:210-215 (2006)).

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos glicosilados también pueden derivarse a partir de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células invertebradas incluyen células de insectos y de plantas. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que pueden utilizarse en conjunción con células de insectos, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse como huéspedes cultivos celulares de plantas (*por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5959177, 6040498, 6420548, 7125978, y 6417429, describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También pueden utilizarse como huéspedes células de vertebrados. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamíferos que están adaptados para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares de mamíferos huésped útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (293 o 293 células según se describe, *por ejemplo*, en Graham et al. *J. Virol. Gen* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK); células de sertoli de ratón (células TM4 según se describe, *por ejemplo*, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK; células de hígado de ratas búfalo (BRL 3A); células pulmonares humanas (W138); células de hígado humanas (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, según se describe, *por ejemplo*, en Mather et al. *Anales N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares de mamíferos huésped útiles incluyen a las células de ovarios de hámster chino (CHO), incluyendo a las células DHFR-CHO (Urlaub et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 77:4216 (1980)); y líneas celulares tales de mieloma como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares de mamíferos huésped adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, *por ejemplo*, Yazaki y Wu, *Métodos en Biología molecular*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003).

Composiciones/formulaciones farmacéuticas

En la presente se proporcionan composiciones farmacéuticas y/o formulaciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, un portador farmacéuticamente aceptable con preferencia es no tóxico para quienes lo reciben en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Los anticuerpos descriptos en la presente pueden formularse dentro de las preparaciones en las formas sólida, semi-sólida, líquida o gaseosa. Los ejemplos de dichas formulaciones incluyen, sin limitación, comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas, y aerosoles. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, portadores de diluyentes farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, los cuales son vehículos comúnmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para la administración a animales o humanos. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, tasa de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición.

En ciertas realizaciones, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrógeno-sulfito de sodio); tampones químicos (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); rellenos; monosacáridos; disacáridos; y otros carbohidratos (tales como

glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, saborizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrofílicos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sales (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, chlorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); solventes (tales como glicerina, propilen glicol o polietilen glicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; surfactantes o agentes humectantes (tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbato tales como polisorbato 20, polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes que mejoran la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes que mejoran la tonicidad (tales como haluros de metal alcalino, con preferencia cloruro de sodio o de potasio, manitol sorbitol); vehículos de suministro; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Los ejemplos adicionales de formulaciones que son adecuadas para diversos tipos de administración pueden encontrarse en *Remington: La Ciencia y Práctica de Farmacia*, Pharmaceutical Press 22da ed. (2013). Para una breve revisión de los métodos para el suministro del fármaco, véase, Langer, *Ciencia* 249:1527-1533 (1990).

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, las cuales pueden comprender antioxidantes, tampones químicos, bacteriostáticos, y solutos que tornan a la formulación isotónica con la sangre del receptor a quien se dirige, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que puedan incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, y conservantes.

Las formulaciones pueden ser optimizadas para la retención y estabilización en el cerebro o sistema nervioso central. Cuando el agente se

administra dentro del compartimento craneal, se desea que el agente se mantenga en el compartimento, y que no se difunda o de otra manera cruce la barrera hematoencefálica. Las técnicas de estabilización incluyen el entrecruzamiento, la multimerización, o la unión a grupos tales como polietilenglicol, poliacrilamida, portadores de proteínas neutrales, etc. con el objeto de lograr un aumento en el peso molecular.

Otras estrategias para aumentar la retención incluyen el atrapamiento del anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, en un implante biodegradable o bioerosionable. La tasa de liberación del agente terapéuticamente activo se controla por medio de la tasa de transporte a través de la matriz polimérica, y la biodegradación del implante. Los implantes pueden ser partículas, láminas, parches, placas, fibras, microcápsulas y similares y pueden ser de cualquier tamaño o forma compatible con el sitio de inserción seleccionado. Las composiciones poliméricas biodegradables que pueden emplearse pueden ser ésters o éteres orgánicos, los cuales cuando se degradan resultan en productos de degradación fisiológicamente aceptables, incluyendo los monómeros. Pueden encontrar uso los anhídridos, amidas, ortoésteres o similares, por ellos mismos o en combinación con otros monómeros. Los polímeros serán polímeros de condensación. Los polímeros pueden ser entrecruzados o no entrecruzados. Son de particular interés los polímeros de ácidos carboxílicos hidroxialifáticos, ya sea homo o copolímeros, y los polisacáridos. Incluidos entre los poliésteres de interés están los polímeros de ácido D-láctico, ácido L-láctico, ácido láctico racémico, ácido glicólico, policaprolactona y las combinaciones de los mismos. Entre los polisacáridos de interés están el alginato de calcio, y las celulosas funcionalizadas, particularmente ésteres de carboximetilcelulosa caracterizados por ser insolubles en el agua, un peso molecular de aproximadamente 5 kD a 500 kD, etc. También pueden

emplearse hidrogeles biodegradables en los implantes de la invención en cuestión. Los hidrogeles son típicamente un material de copolímero, caracterizado por la capacidad para embeber un líquido.

Usos terapéuticos

Según se divulga en la presente, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación pueden utilizarse para prevenir, reducir el riesgo, o tratar enfermedades y trastornos.

En un aspecto de la invención, un agente que regula hacia abajo a SIRPA, *por ejemplo*, un anticuerpo anti-SIRPA, se utiliza como un agente terapéutico. Dichos agentes se administran para tratar, aliviar, y/o prevenir una enfermedad o patología asociada con la expresión, actividad y/o señalización de SIRPA en un sujeto. Se lleva a cabo un régimen terapéutico mediante la identificación de un sujeto, *por ejemplo*, un paciente humano que sufre de (o en riesgo de desarrollar) una enfermedad o trastorno asociado con la expresión, actividad y/o señalización de SIRPA, *por ejemplo*, un cáncer u otro trastorno neoplásico, utilizando métodos estándar. En algunas realizaciones, las células que tienen la patología asociada con la expresión, actividad y/o señalización de SIRPA, expresan un ligando de SIRPA, *por ejemplo*, CD47. En algunas realizaciones, las células que tienen la patología asociada con la expresión, actividad y/o señalización de SIRPA, expresan SIRPA.

Según se detalla más aún a continuación un agente que regula hacia abajo a SIRPA, *por ejemplo*, un anticuerpo anti-SIRPA puede utilizarse en combinación con un agente terapéutico adicional que se usa para tratar la enfermedad o patología asociada con la expresión, actividad, y/o señalización de SIRPA. Los términos “en combinación” y “en conjunción” se utilizan indistintamente en la presente divulgación. El agente terapéutico adicional que se administra en

combinación con un anticuerpo anti-SIRPA puede administrarse antes, después, o de modo concurrente con el agente que regula hacia abajo a SIRPA, *por ejemplo*, un anticuerpo anti-SIRPA.

En un aspecto de la presente divulgación, la preparación de un anticuerpo anti-SIRPA, *por ejemplo*, que comprende un anticuerpo anti-SIRPA que disminuye la expresión de SIRPA sobre la superficie celular, pero que no bloquea sustancialmente la unión de ligando, *por ejemplo*, CD47, a SIRPA, se administra a un sujeto humano. La administración del anticuerpo puede anular o inhibir o interferir con la función de expresión, actividad y/o señalización de SIRPA que está mediada por la unión al ligando, *por ejemplo*, la unión a CD47.

En una realización la enfermedad o trastorno asociado con la expresión de SIRPA es el cáncer. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA se administra a un paciente que tiene un cáncer, tal como un trastorno proliferativo hematológico de las células mieloides, que expresa SIRPA. En realizaciones típicas, un anticuerpo anti-SIRPA se administra a un paciente que tiene un cáncer que expresa CD47.

En ciertas realizaciones, un cáncer a prevenir o tratar por medio de los métodos de la presente divulgación incluye, sin limitación, carcinoma de células escamosas (*por ejemplo*, carcinoma epitelial de células escamosas), cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas escamosas (NSCLC), adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, NSCLC no escamoso, glioma, cáncer peritoneal, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal y cáncer del estroma gastrointestinal, cáncer renal (*por ejemplo* carcinoma de células claras), cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (*por ejemplo*, carcinoma de células renales (RCC),

cáncer de próstata (*por ejemplo* adenocarcinoma de próstata refractario a las hormonas), cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma (glioblastoma multiforme), cáncer cervical, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon, y cáncer (o carcinoma) de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, asesiño natural sinonasal, melanoma (*por ejemplo*, melanoma maligno metastásico, tal como melanoma maligno intraocular o cutáneo), cáncer óseo, cáncer de piel, cáncer uterino, cáncer de la región anal, cáncer testicular, carcinoma de las trompas de falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endócrino, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma del tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, tumores sólidos de la infancia, cáncer del uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasma del sistema nervioso central (CNS), linfoma primario del CNS, síndromes mielodisplásicos, neoplasias colorrectales, tumores sólidos, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco cerebral, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres inducidos por el medioambiente incluyendo aquéllos inducidos por asbesto, cánceres relacionados con virus (*por ejemplo*, tumor relacionado con el virus del papiloma humano (HPV), y malignidades hematológicas derivadas de cualquiera de los dos principales linajes de glóbulos, es decir, la línea de células mieloides (las cuales producen granulocitos, eritrocitos, trombocitos, macrófagos y mastocitos) o la línea de células linfoides (las cuales producen B, T, NK y células plasmáticas), tal como todos los tipos de leucemias, linfomas, y mielomas, *por ejemplo*, leucemia aguda, crónica, linfocítica y/o mielógena, tal como leucemia aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), y leucemia

mielógena crónica (CML), AML indiferenciada (M0), leucemia mieloblástica (M1), leucemia mieloblástica (M2; con maduración celular), leucemia promielocítica (M3 o variante M3 [M3V]), leucemia mielomonocítica (M4 o variante M4 con eosinofilia [M4E]), leucemia monocítica (M5), eritroleucemia (M6), leucemia megacarioblástica (M7), sarcoma granulocítico aislado, y cloroma; linfomas, tales como linfoma de Hodgkin (HL), linfoma de no Hodgkin (NHL), linfoma indolente, linfoma difuso de células B grandes, malignidad hematológica de células B, *por ejemplo*, linfomas de células B, linfomas de células T, linfoma linfoplasmocitoides, linfoma de células B monocitoides, linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT), linfoma anaplásico (*por ejemplo*, Ki 1+) de células grandes, linfoma/leucemia de células T en adultos, linfoma de células del manto, linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma angiocéntrico, linfoma intestinal de células T, linfoma mediastínico primario de células B, linfoma linfoblástico de células T precursoras, y linfoma/leucemia linfoblástico de células T (T-Lbly/T-ALL), linfoma periférico de células T, linfoma linfoblástico, trastorno linfoproliferativo post-trasplante, linfoma histiocítico verdadero, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma de derrame primario, linfoma linfoblástico (LBL), tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, leucemia linfoblástica aguda, linfoma difuso de células B grandes, (DLBCL) (incluyendo pacientes con DLBCL que son refractarios primarios, refractarios a Rituximab, refractarios a Rituximab/CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona), con DLBCL recidivante o refractaria (R/R), y/o pacientes con DLBCL ineligibles para CAR-T), linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma histiocítico difuso (DHL), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico de células B precursoras, linfoma cutáneo de células T (CTLC) (también denominado micosis fungoide o síndrome de Sézari), y linfoma linfoplasmocítico (LPL) con macroglobulinemia de Waldenstrom; mielomas, tales como mieloma IgG, mieloma de cadenas ligeras, mieloma no

secretor, mieloma latente (también denominado mieloma indolente), plasmacitoma solitario, y mielomas múltiples, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de células pilosas; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, tumores de origen mesenquimal, que incluyen fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; seminoma, teratocarcinoma, tumores del nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, schwannomas; tumores de origen mesenquimal, que incluyen fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer de tiroides folicular y teratocarcinoma, tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, por ejemplo tumores de células T y de células B, que incluyen pero no se limitan a trastornos de las células T tales como leucemia prolinfocítica de células T (T-PLL), incluyendo del tipo de células pequeñas y cerebriforme; leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL) con preferencia del tipo de células T; linfoma hepatosplástico a/d T-NHL; linfoma periférico/post-tímico de células T (subtipos pleomórfico e inmunoblástico); linfoma angiocéntrico (nasal) de células T; cáncer de la cabeza o cuello, cáncer renal, cáncer de recto, cáncer de la glándula tiroides; linfoma mieloide aguda, así como también cualquiera de las combinaciones de estos cánceres. Un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación también puede utilizarse para tratar el cáncer metastásico.

En algunas realizaciones, el cáncer está seleccionado de sarcoma, cáncer de vejiga, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de pelvis renal, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, linfoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, y fibrosarcoma. En algunas realizaciones, el cáncer es carcinoma de mama triple negativo. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser un cáncer de etapa temprana o un cáncer de etapa tardía. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser un tumor primario. En algunas realizaciones, el cáncer puede ser un

tumor metastásico en un segundo sitio derivado a partir de cualquiera de los tipos de cáncer anteriores.

En algunas realizaciones, el cáncer está seleccionado de glioblastoma multiforme; carcinoma renal de células claras; carcinoma adrenocortical; carcinoma urotelial de vejiga; linfoma difuso de células B grandes; adenocarcinoma de pulmón; adenocarcinoma de páncreas, cáncer de células renales, linfoma de no Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide crónica (CML), mieloma múltiple, carcinoma de mama invasivo, carcinoma cervical de células escamosas, adenocarcinoma endocervical, colangiocarcinoma, adenocarcinoma de colon, linfoma difuso de células B grandes, carcinoma esofágico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cromóforo renal, carcinoma papilar de células renales, glioma de bajo grado, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas de pulmón, mesotelioma, cistoadenocarcinoma seroso ovárico, adenocarcinoma de páncreas, feocromocitoma y paraganglioma, adenocarcinoma de próstata, adenocarcinoma de recto, melanoma cutáneo, adenocarcinoma de estómago, tumores de células germinales testiculares, carcinoma de tiroides, timoma, carcinoma endometrial del cuerpo uterino, carcinosarcoma uterino, y melanoma uveal.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de prevención, reducción del riesgo, o tratamiento de un individuo que tiene cáncer, en donde el individuo es refractario a la terapia con inhibidores de punto de control, mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de prevención, reducción del riesgo, o tratamiento de un individuo que tiene cáncer,

mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación puede administrarse en conjunción con un agente terapéutico que actúa como inhibidor de punto de control. En algunas realizaciones, el método incluye además la administración al individuo de al menos un anticuerpo que específicamente se une a una molécula inhibidora de punto de control inmune, y/u otra terapia anticancerígena estándar o de investigación. En algunas realizaciones, la molécula inhibidora de punto de control está seleccionada de PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, y CD73. En realizaciones típicas, el agente terapéutico es un anticuerpo para un inhibidor de punto de control seleccionado de D1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, o CD73. En algunas realizaciones, el al menos un anticuerpo que específicamente se une a una molécula inhibidora de punto de control se administra en combinación con el anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación. En algunas realizaciones, una combinación de anticuerpos a dirigirse contra inhibidores de punto de control se administra en conjunción con un anticuerpo anti-SIRPA de la presente invención.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación puede administrarse en conjunción con al menos un anticuerpo agonístico que específicamente se une a una proteína estimuladora de punto de control, por ejemplo, un anticuerpo agonista anti-CD40, un anticuerpo agonista anti-OX40, un anticuerpo agonista anti-ICOS, un anticuerpo agonista anti-CD28,

un anticuerpo agonístico anti-TREM1, un anticuerpo agonístico anti-TREM2, un anticuerpo agonista anti-CD137/4-1BB, un anticuerpo agonista anti-CD27, un anticuerpo agonista anti-proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides GITR, un anticuerpo agonista anti-CD30, un anticuerpo agonista anti-BTLA, un anticuerpo agonista anti-HVEM, un anticuerpo agonista anti-CD2, un anticuerpo agonista anti-CD5, y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el método incluye además la administración al individuo de al menos un anticuerpo que específicamente se une a una molécula inhibidora de punto de control inmune, y/u otra terapia anticancerígena estándar o de investigación. En algunas realizaciones, el al menos un anticuerpo que específicamente se une a una molécula inhibidora de punto de control se administra en combinación con el anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el al menos un anticuerpo que específicamente se une a una molécula inhibidora de punto de control está seleccionado de un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-CTLA4, un anticuerpo anti-PD-L2, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-B7-H3, un anticuerpo anti-B7-H4, y anticuerpo anti-HVEM, un anticuerpo atenuador de anti-linfocitos B y T (BTLA), un anticuerpo anti receptor inhibidor asesino (KIR), un anticuerpo anti-GAL9, un anticuerpo anti-TIM3, un anticuerpo anti-A2AR, un anticuerpo anti-LAG-3, un anticuerpo anti-fosfatidilserina, un anticuerpo anti-CD27, y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la terapia anticancerígena estándar o de investigación es una o más terapias seleccionadas de radioterapia, quimioterapia citotóxica, terapia dirigida, imatinib (Gleevec®), trastuzumab (Herceptin®), transferencia de células adoptiva (ACT), transferencia de células T del receptor de antígeno quimérico (CAR-T), terapia con vacunas, y terapia con citoquinas. En algunas realizaciones, el método incluye además la administración al individuo de al menos un anticuerpo que

específicamente se une a una citoquina inhibidora. En algunas realizaciones, el al menos un anticuerpo que específicamente se une a una citoquina inhibidora se administra en combinación con el anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el al menos un anticuerpo que específicamente se une a una citoquina inhibidora está seleccionado de un anticuerpo anti-CCL2, un anticuerpo anti-CSF-1, un anticuerpo anti-IL-2, y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el método incluye además la administración al individuo de al menos un anticuerpo agonístico que específicamente se une a una proteína estimuladora de punto de control inmune. En algunas realizaciones, el al menos un anticuerpo agonístico que específicamente se une a una proteína estimuladora de punto de control se administra en combinación con el anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el al menos un anticuerpo agonístico que específicamente se une a una proteína estimuladora de punto de control está seleccionado de un anticuerpo agonista anti-CD40, un anticuerpo agonista anti-OX40, un anticuerpo agonista anti-ICOS, un anticuerpo agonista anti-CD28, un anticuerpo agonista anti-CD137/4-1BB, un anticuerpo agonista anti-CD27, un anticuerpo agonista anti-proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides GITR, y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente invención se administra en combinación con terapia de radiación y/o un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo, los siguientes grupos: agentes antimetabolitos/anticancerígenos, tales como análogos de pirimidina (5-fluorouracilo, floxuridina, capecitabina, gemcitabina y citarabina) y análogos de purina, antagonistas del folato e inhibidores relacionados (metotrexato, pemetrexed, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina y 2-clorodeoxiadenosina (cladribina)); agentes antiproliferativos/antimitóticos que

incluyen productos naturales tales como vinca alcaloides (vinblastina, vincristina, y vinorelbina), disruptores de microtúbulos tales como taxano (paclitaxel, docetaxel), vincristina, vinblastina, nocodazol, epotilonas, eribulina y navelbine; epidipodofilotoxinas (etopósido, tenipósido); agentes que dañan el ADN (actinomicina, amsacrina, antraciclinas, bleomicina, busulfano, camptotecina, carboplatino, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, Citoxan, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, hexametilmelaminóxaliplatino, ifosfamida, melfalán, mercloretamina, mitomicina, mitoxantrona, nitrosourea, plicamicina, procarbazona, taxol, taxotere, temozolamida, tenipósido, trietilentiófosforamida y etopósido (VP 16)); inhibidores del ADN metiltransferasa (azacitidina); antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina, doxorubicina (adriamicina), idarubicina, antraciclinas, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mitramicina) y mitomicina; enzimas (L-asparaginasa que sistémicamente metaboliza L-asparagina y priva a las células que no tienen la capacidad de sintetizar su propia asparagina); agentes antiplaquetarios; agentes alquilantes antiproliferativos/antimitóticos tales como mostazas nitrogenadas (mecloretamina, ciclofosfamida y análogos, melfalán, clorambucilo), etileniminas y metilmelaminas (hexametilmelamina y tiotepa), alquilsulfonatos (busulfano), nitrosoureas (carmustina (BCNU) y análogos, estrepto-zocina), triazenos (dacarbazina (DTIC)); antimetabolitos antiproliferativos/antimitóticos tales como análogos de ácido fólico (metotrexato); complejos de coordinación de platino (cisplatino, carboplatino), procarbazona, hidroxourea, mitotano, aminoglútetimida; hormonas, análogos de hormonas (estrógeno, tamoxifeno, goserelina, bicalutamida, nilutamida) e inhibidores de aromatasa (letrozol, anastrozol); anticoagulantes (heparina, sales de heparina sintética y otros inhibidores de trombina); agentes fibrinolíticos (tales como el activador tisular del plasminógeno, estreptoquinasa y uroquinasa), aspirina,

dipiridamol, ticlopidina, clopidogrel, abciximab; agentes antimigratorios; agentes antiseoretos (breveldin – sic-); inmunosupresores (ciclosporina, tacrolimus (FK-506), sirolimus (rapamicina), azatioprina, micofenolato de mofetilo); compuestos antiangiogénicos (TNP470, genisteina, pomalidomida) e inhibidores del factor de crecimiento (inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), tales como ziv-aflibercept; inhibidores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)); inhibidores de los antagonistas de la proteína de la apoptosis (IAP) (birinapant); inhibidores de histona desacetilasa (HDAC) (vorinostat, romidepsina, chidamide, panobinostat, mocetinostat, abexinostat, belinostat, entinostat, resminostat, givinostat, quisinostat, SB939); inhibidores de proteasoma (ixazomib); bloqueador de receptores de angiotensina; donantes de óxido nítrico; oligonucleótidos antisentido; anticuerpos (trastuzumab, panitumumab, pertuzumab, cetuximab, adalimumab, golimumab, infliximab, rituximab, ocrelizumab, ofatumumab, obinutuzumab, alemtuzumab, abciximab, atlizumab, daclizumab, denosumab, efalizumab, elotuzumab, rovelizumab, ruplizumab, ustekinumab, visilizumab, gemtuzumab ozogamicin, brentuximab -sic- vedotina); receptores de antígeno quimérico; inhibidores del ciclo celular (flavopiridol, roscovitina, briostatina-1) e inductores de diferenciación (tretinoína); inhibidores de mTOR, inhibidores de topoisomerasa (doxorrubicina (adriamicina), amsacrina, camptotecina, daunorubicina, dactinomicina, eniposide -sic-, epirubicina, etopósido, idarubicina, irinotecán (CPT-11) y mitoxantrona, topotecán, irinotecán), corticosteroides (cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, y prenisolona); inhibidores de la PARP (niraparib, olaparib); inhibidores de la quinasa de adhesión focal (FAK) (defactinib (VS-6063), VS-4718, VS-6062, GSK2256098); inhibidores de la quinasa de transducción de señal del factor de crecimiento (cediranib, galunisertib, rociletinib, vandetanib, afatinib, EGF816, AZD4547); inhibidores de c-Met (capmatinib, INC280); inhibidores de

ALK (ceritinib, crizotinib); inductores de disfunción mitocondrial, toxinas tales como toxina del Cólera, ricina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*, o toxina diftérica, y activadores de caspasa; y disruptores de cromatina. En algunas realizaciones, un agente quimioterapéutico es un inhibidor de B-Raf, un inhibidor de MEK, un inhibidor de VEGF, un inhibidor de VEGFR, un inhibidor de tirosina quinasa, un agente anti-mitótico, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se administra en combinación con terapia de transferencia celular adoptiva (ACT), terapia de transferencia de células T del receptor de antígeno quimérico (CAR-T), terapia con vacunas, y/o terapia con citoquinas.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se administra en combinación con al menos un anticuerpo que específicamente se une a una citoquina inhibidora, *por ejemplo*, una citoquina inhibidora tal como un anticuerpo anti-CCL2, un anticuerpo anti-CSF-1, o un anticuerpo anti-IL-2.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación se administra en combinación con al menos una citoquina estimuladora. En algunas realizaciones ello puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la al menos una citoquina estimuladora está seleccionada de IFN- α 4, IFN- β , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, CRP, miembros de la familia IL-20, LIF, IFN- γ , OSM, CNTF, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, CXCL10, IL-33, MCP-1, MIP-1-beta, y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, un agente que regula hacia abajo a SIRPA, *por ejemplo*, un anticuerpo anti-SIRPA, se administra a un paciente que tiene un trastorno neurológico, o se administra para reducir el riesgo, retrasar el comienzo,

o prevenir un trastorno neurológico. En algunas realizaciones, el trastorno neurológico es demencia, incluyendo demencia, demencia frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington, enfermedad de Taupatía, o esclerosis múltiple.

En algunas realizaciones, un agente que regula hacia abajo a SIRPA, *por ejemplo*, un anticuerpo anti-SIRPA, se administra a un paciente que tiene enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de Taupatías, o esclerosis múltiple. En algunas realizaciones, el agente se administra a un paciente que tiene enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hidrocefalia de presión normal, enfermedad de Nasu-Hakola, accidente cerebrovascular, una infección, lesión cerebral traumática, parálisis supranuclear progresiva, demencia pugilística (encefalopatía traumática crónica), Parkinsonismo ligado al cromosoma 17, enfermedad de Lytico-Bodig (complejo Parkinson-demencia de Guam), demencia ovillo-predominante, ganglioglioma y gangliocitoma, meningioangiomatosis, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalopatía por plomo, esclerosis tuberosa, enfermedad de Hallervorden-Spatz, lipofuscinosis, enfermedad de Pick, degeneración corticobasal, enfermedad del grano argirofílico (AGD), degeneración lobar frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples, Síndrome de Shy-Drager, parálisis supranuclear progresiva, o degeneración gangliónica basal cortical.

Demencia

La demencia es un síndrome no específico (*es decir*, un conjunto de signos y síntomas) que se presenta como una seria pérdida de la capacidad cognitiva global en una persona previamente no discapacitada, más allá de lo que podría esperarse a partir del envejecimiento normal. La demencia puede ser estática

como el resultado de una única lesión cerebral global. Alternativamente, la demencia puede ser progresiva, resultando en el declive a largo plazo debido al daño o enfermedad en el cuerpo. Mientras que la demencia es mucho más común en la población geriátrica, ésta también puede tener lugar antes de la edad de 65. Las áreas cognitivas afectadas por la demencia incluyen, sin limitación, la memoria, la capacidad de atención, el lenguaje, y la resolución de problemas. Generalmente, los síntomas deben estar presentes durante al menos seis meses antes de que un individuo sea diagnosticado con demencia.

Las formas ejemplificativas de demencia incluyen, sin limitación, demencia frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia semántica, y demencia con cuerpos de Lewy.

En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación puede prevenir, reducir el riesgo, y/o tratar la demencia. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-SIRPA puede modular una o más actividades de SIRPA en un individuo que tiene demencia.

Demencia frontotemporal

La demencia frontotemporal (FTD) es una afección que resulta del deterioro progresivo del lóbulo frontal del cerebro. Con el transcurso del tiempo, la degeneración puede avanzar hacia el lóbulo temporal. Segunda en prevalencia solamente a la enfermedad de Alzheimer (AD), la FTD cuenta con el 20% de casos de demencia presenil. Las características clínicas de la FTD incluyen déficits de memoria, anomalías de comportamiento, cambios en la personalidad, y deterioro en el lenguaje (Cruts, M. & Van Broeckhoven, C., Trends Genet. 24:186-194 (2008); Neari, D., et al., Neurología 51:1546-1554 (1998); Ratnavalli, E., Braine, C., Dawson, K. & Hodges, J. R., Neurología 58:1615-1621 (2002)).

Una porción sustancial de casos de FTD son heredados en una manera autosómica dominante, pero aún en una familia, los síntomas pueden abarcar un espectro desde FTD con trastornos de comportamiento, hasta Afasia Primaria Progresiva, hasta Degeneración Gangliónica Corticobasal. La FTD, como la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, puede caracterizarse por la presencia patológica de agregados de proteínas específicos en el cerebro enfermo. Históricamente, las primeras descripciones de la FTD reconocieron la presencia de acumulaciones intraneuronales de proteína Tau hiperfosforilada en nudos neurofibrilares o cuerpos de Pick. Un rol causal para la proteína Tau asociada a microtúbulos fue soportado por la identificación de mutaciones en el gene que codifica la proteína Tau en diversas familias (Hutton, M., et al., *Naturaleza* 393:702-705 (1998)). Sin embargo, la mayoría de los cerebros con FTD muestran no acumulación de Tau hiperfosforilada pero sí presentan inmunorreactividad a la ubiquitina (Ub) y a la proteína de unión a TAR DNA (TDP43) (Neumann, M., et al., *Arq. Neurol.* 64:1388-1394 (2007)). Una mayoría de esos casos de FTD con inclusiones de Ub (FTD-U) mostraron llevar a cabo mutaciones en el gen de Progranulina.

En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, puede prevenir, reducir el riesgo, y/o tratar la FTD. En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-SIRPA, puede modular una o más actividades de SIRPA en un individuo que tiene FTD.

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD) es la forma más común de demencia. No hay cura para la enfermedad, la cual empeora a medida que progresa, y eventualmente conduce a la muerte. Más a menudo, la AD se diagnostica en personas mayores de 65 años. Sin embargo, el menos prevalente comienzo

temprano del Alzheimer puede ocurrir mucho tiempo antes. Los síntomas comunes de la enfermedad de Alzheimer incluyen, síntomas de comportamiento, tales como dificultad para recordar eventos recientes; síntomas cognitivos, confusión, irritabilidad y agresión, cambios de humores, problemas con el lenguaje, y pérdida de la memoria a largo plazo. A medida que la enfermedad progresa se pierden las funciones corporales, conduciendo por último a la muerte. La enfermedad de Alzheimer se desarrolla durante una cantidad de tiempo desconocida y variable antes de tornarse completamente evidente, y ésta puede progresar sin diagnosticarse durante años.

En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación puede prevenir, reducir el riesgo, y/o tratar la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-SIRPA puede modular una o más actividades de SIRPA en un individuo que tiene enfermedad de Alzheimer.

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson, a la cual se puede hacer referencia como parkinsonismo idiopático o primario, síndrome hipocinético rígido (HRS), o parálisis agitans, es un trastorno cerebral neurodegenerativo que afecta el control del sistema motor. La muerte progresiva de las células productoras de dopamina en el cerebro conduce a los principales síntomas del Parkinson. Más a menudo, la enfermedad de Parkinson se diagnostica en personas mayores a 50 años de edad. La enfermedad de Parkinson es idiopática (que no tiene causa) en la mayoría de la gente. Sin embargo, los factores genéticos también desempeñan un rol en la enfermedad.

Los síntomas de la enfermedad de Parkinson incluyen, sin limitación, temblores de las manos, brazos, piernas, mandíbula, y cara, rigidez muscular en

los miembros y en el tronco, lentitud de movimientos (bradicinesia), inestabilidad postural, dificultad para caminar, problemas neuropsiquiátricos, cambios en el habla o en el comportamiento, depresión, ansiedad, dolor, psicosis, demencia, alucinaciones, y problemas para dormir.

En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación puede prevenir, reducir el riesgo, y/o tratar la enfermedad de Parkinson. En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-SIRPA puede modular una o más actividades de SIRPA en un individuo que tiene la enfermedad de Parkinson.

Esclerosis lateral amiotrófica (ALS)

Como se usa en la presente, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) o, enfermedad de las neuronas motoras o, enfermedad de Lou Gehrig se utilizan indistintamente y se refieren a una enfermedad debilitante con variada etiología caracterizada por una debilidad rápidamente progresiva, atrofia muscular y fasciculaciones, espasticidad muscular, dificultad para hablar (disartria), dificultad para tragar (disfagia), y dificultad para respirar (disnea).

Se ha demostrado que la Progranulina desempeña un papel en la ALS (Schimick, JC et al., (2007) J[0343] Neurol Neuroquirúr Psiquiát.;78:754-6) y protege contra el daño ocasionado por las proteínas causantes de ALS tales como TDP-43 (Laird, AS et al., (2010). PLoS ONE 5: e13368). También se demostró que pro-NGF induce la muerte de oligodendrocitos y neuronas corticoespinales mediada por p75 y siguiendo a la lesión de la médula espinal (Beatty et al., Neurona (2002),36, págs. 375-386; Giehl et al, Proc. Natl. Acad. Sci Estados Unidos (2004), 101, págs. 6226-30).

En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación puede prevenir, reducir el riesgo, y/o tratar ALS. En

algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-SIRPA puede modular una o más actividades de SIRPA en un individuo que tiene esclerosis lateral amiotrófica.

Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (HD) es una enfermedad neurodegenerativa heredada causada por una mutación dominante autosómica en el gen Huntingtin (HTT). La expansión de una repetición del triplete citoquina-adenina-guanina (CAG) dentro del gen Huntingtin resulta en la producción de una forma mutante de la proteína Huntingtin (Htt) codificada por este gen. Esta proteína Huntingtin mutante (mHtt) es tóxica y contribuye a la muerte neuronal. Los síntomas de la enfermedad de Huntington más comúnmente aparecen entre las edades de 35 y 44, aunque ellos pueden aparecer en cualquier edad.

Los síntomas de la enfermedad de Huntington, incluyen, sin limitación, problemas en el control motor, espasmos, movimientos aleatorios (corea), movimientos anormales de los ojos, equilibrio deteriorado, convulsiones, dificultad para respirar, dificultad para tragar, problemas cognitivos, habla alterada, déficits de la memoria, dificultades para pensar, insomnio, fatiga, demencia, cambios en la personalidad, depresión, ansiedad, y comportamiento compulsivo.

En algunas realizaciones, la administración de como (sic) un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación puede prevenir, reducir el riesgo, y/o tratar la enfermedad de Huntington (HD). En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-SIRPA puede modular una o más actividades de SIRPA en un individuo que tiene la enfermedad de Huntington.

Enfermedad de Tauopatía

La enfermedad de Tauopatías, o Tauopatías, son una clase de enfermedad neurodegenerativa causada por la acumulación de la proteína tau asociada a

microtúbulos dentro del cerebro. La enfermedad de Alzheimer (AD) es la enfermedad de tauopatía más conocida e involucra una acumulación de proteína tau dentro de las neuronas en forma de nudos neurofibrilares insolubles (NFTs). Otras enfermedades de tauopatías y trastornos incluyen parálisis supranuclear progresiva, demencia pugilística (encefalopatía traumática crónica), demencia frontotemporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17, enfermedad de Lytico-Bodig (complejo Parkinson-demencia de Guam), Demencia ovillo-predominante, Ganglioglioma y gangliocitoma, Meningioangiomatosis, Panencefalitis esclerosante subaguda, Encefalopatía por plomo, esclerosis tuberosa, Enfermedad de Hallervorden-Spatz, lipofuscinosis, enfermedad de Pick, degeneración corticobasal, enfermedad del grano argirofílico (AGD), enfermedad de Huntington, y degeneración lobar frontotemporal.

En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación, puede prevenir, reducir el riesgo, y/o tratar la enfermedad de tauopatía. En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-SIRPA puede modular una o más actividades de SIRPA en un individuo que tiene una enfermedad de tauopatía.

Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (MS) también puede ser referida como esclerosis diseminada o encefalomielitis diseminada. La MS es una enfermedad inflamatoria en la cual las vainas de mielina grasas alrededor de los axones del cerebro y médula espinal están dañadas, conduciendo a la desmielinización y cicatrización así como también a un amplio espectro de signos y síntomas. La MS afecta la capacidad de las células nerviosas en el cerebro y médula espinal de comunicarse entre sí de modo efectivo. Las células nerviosas se comunican enviando señales eléctricas denominadas potenciales de acción hacia abajo a lo

largo de fibras denominadas axones, los cuales se encuentran contenidos dentro de una sustancia aislante denominada mielina. En la MS, el propio sistema inmunológico del cuerpo ataca y daña a la mielina. Cuando se pierde la mielina, los axones ya no pueden conducir las señales de modo efectivo. El comienzo de la MS usualmente ocurre en adultos jóvenes, y es más común en las mujeres.

Los síntomas de la MS incluyen, sin limitación, cambios en las sensaciones, tales como la pérdida de sensibilidad u hormigueo; pinchazo o entumecimiento, tales como hipoestesia y parestesia; debilidad muscular; clonus; espasmos musculares; dificultad en el movimiento; dificultades con la coordinación y balance, tales como ataxia; problemas en el habla, tales como disartria, o al tragar, tales como disfagia; problemas visuales, tales como nistagmo, neuritis óptica que incluye fosfenos, y diplopía; fatiga; dolor agudo o crónico; y dificultades en la vejiga e intestinos; deterioro cognitivo de diversos grados; síntomas emocionales de depresión o humor inestable; fenómeno de Uhthoff, el cual consiste en una exacerbación de los síntomas existentes debido a una exposición a temperaturas ambientes más elevadas de lo usual; y signo de Lhermitte, el cual es una sensación eléctrica que se desliza hacia abajo de la espalda cuando se dobla el cuello.

En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-SIRPA de la presente divulgación puede prevenir, reducir el riesgo, y/o tratar la esclerosis múltiple. En algunas realizaciones, la administración de un anticuerpo anti-SIRPA puede modular una o más actividades de SIRPA en un individuo que tiene esclerosis múltiple.

En algunas realizaciones, un sujeto o un individuo es un mamífero. Los mamíferos incluyen, sin limitación, animales domesticados (*por ejemplo*, vacas, ovejas, gatos, perros, y caballos), primates (*por ejemplo*, humanos y primates no

humanos tales como monos), conejos, y roedores (*por ejemplo*, ratones y ratas). En algunas realizaciones, el sujeto o individuo es un humano.

Un anticuerpo proporcionado en la presente (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse a través de cualquier medio adecuado, que incluye a la administración parenteral, intrapulmonar, intranasal, intralesional, o a las vías intracerebroespinal, intracraneal, intraespinal, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o de inhalación. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa como un bolo o a través de infusión continua durante un período de tiempo, la administración intraarterial, intraarticular, intraperitoneal, o subcutánea. En algunas realizaciones, la administración es administración intravenosa. En algunas realizaciones, la administración es subcutánea. La dosificación puede ser a través de cualquier vía adecuada, *por ejemplo* por medio de inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En la presente se contemplan diversos esquemas de dosificación que incluyen pero no se limitan a administraciones únicas o múltiples durante diversos puntos temporales, la administración en bolos, y la infusión de pulso.

Los anticuerpos proporcionados en la presente serían formulados, dosificados, y administrados de una manera consistente con una buena práctica médica. Los factores para considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la condición clínica del individuo paciente, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos por los profesionales médicos. El anticuerpo no necesita serlo pero está opcionalmente formulado con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo

presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento, y de otros factores planteados anteriormente. Éstos generalmente se utilizan en las mismas dosificaciones y con las vías de administración según se describe en la presente, o aproximadamente desde 1 a 99% de las dosificaciones descritas en la presente, o en cualquier dosificación y a través de cualquier vía que sea determinada empíricamente/clínicamente como apropiada.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se utiliza solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratarse, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y de la discreción del médico tratante. El anticuerpo se administra de modo adecuado al paciente una vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) del anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por medio de una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría tener un rango desde aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o un tiempo mayor, dependiendo de la afección, el tratamiento generalmente se mantendría hasta que ocurra una deseada supresión de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación del anticuerpo ejemplificativa se encontraría en el rango desde aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg. De este modo, puede administrarse al paciente una o más dosis de

aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse de modo intermitente, *por ejemplo*, cada semana o cada tres semanas (*por ejemplo*, de modo tal que el paciente reciba desde aproximadamente dos hasta aproximadamente veinte, o *por ejemplo*, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). En ciertas realizaciones, la frecuencia de la dosificación es tres veces por día, dos veces por día, una vez por día, una vez cada dos días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada nueve semanas, una vez cada diez semanas, o una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, o durante más tiempo. Puede administrarse una dosis de carga inicial más alta, seguida por una o más dosis más bajas. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se monitorea fácilmente a través de técnicas y ensayos convencionales.

Usos diagnósticos

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, cualquiera de los anticuerpos anti-SIRPA proporcionados en la presente es útil para detectar la presencia de SIRPA en una muestra o en un individuo. El término “detectar” como se usa en la presente abarca a la detección cuantitativa o cualitativa. En la presente se proporcionan métodos de utilización de los anticuerpos de esta divulgación para propósitos de diagnóstico, tales como la detección de SIRPA en un individuo o en muestras de tejido derivadas de un individuo. En algunas realizaciones, el individuo es un humano.

El método de detección puede involucrar la cuantificación del anticuerpo unido a antígeno. La detección del anticuerpo en muestras biológicas puede tener

lugar con cualquier método conocido en la técnica, incluyendo microscopía de inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, ELISA, análisis FACS, inmunoprecipitación, o tomografía por emisión de micro-positrones. En ciertas realizaciones, el anticuerpo está radiomarcado, por ejemplo con ^{18}F y posteriormente se detecta utilizando análisis de tomografía por emisión de micro-positrones. La unión a anticuerpo también se puede cuantificar en un paciente a través de técnicas no invasivas tales como tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada de rayos X, tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT), tomografía computada (CT), y tomografía axial computarizada (CAT).

Artículos de Elaboración

En la presente se proporcionan artículos de elaboración (*por ejemplo*, kit) que comprende un anticuerpo anti-SIRPA descrito en la presente. Artículo de elaboración puede incluir uno o más recipientes que comprenden un anticuerpo descrito en la presente. Los recipientes pueden ser cualquier embalaje adecuado que incluye, pero no se limita a, viales, botellas, tarros, embalaje flexible (*por ejemplo*, sellado Mylar o bolsas plásticas), y similares. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, embalajes a granel (*por ejemplo*, embalajes multidosis) o dosis subunitarias.

En algunas realizaciones, los kits pueden incluir además un segundo agente. En algunas realizaciones, el segundo agente es un tampón o agente diluyente farmacéuticamente aceptable que incluye, pero no se limita a, tales como agua bacteriostática para inyección (BWFI), tampón fosfato salino, solución de Ringer y solución de dextrosa. En algunas realizaciones, el segundo agente es un agente farmacéuticamente activo según se describió anteriormente.

En algunas realizaciones de cualquiera de los artículos de elaboración, el artículo de elaboraciones (sic) incluye además instrucciones para utilizar de acuerdo con los métodos de esta divulgación. Las instrucciones generalmente incluyen información con respecto a la dosificación, esquema de dosificación, y vía de la administración para el tratamiento que se tiene por objeto. En algunas realizaciones, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración del anticuerpo anti-SIRPA aislado de la presente divulgación (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-SIRPA descrito en la presente) para prevenir, reducir el riesgo, o tratar a un individuo que tiene una enfermedad, trastorno, o lesión seleccionados de demencia, demencia frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia mixta, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hidrocefalia de presión normal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de Taupatía, enfermedad de Nasu-Hakola, accidente cerebrovascular, trauma agudo, trauma crónico, lupus, colitis aguda y crónica, artritis reumatoide, cicatrización de heridas, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, obesidad, malaria, temblor esencial, lupus del sistema nervioso central, enfermedad de Behcet, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples, síndrome de Shi-Drager, parálisis supranuclear progresiva, degeneración gangliónica basal cortical, encefalomielitis aguda diseminada, trastornos granulomatosos, sarcoidosis, enfermedades del envejecimiento, convulsiones, lesión de la médula espinal, lesión cerebral traumática, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, retinitis pigmentosa, degeneración de la retina, infección del tracto respiratorio, sepsis, infección ocular, infección sistémica, lupus, artritis, esclerosis múltiple, baja densidad ósea, osteoporosis, osteogénesis, enfermedad osteopetrótica (sic), enfermedad ósea de Paget, y cáncer que incluye cáncer de vejiga, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer

de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, linfoma de no Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, fibrosarcoma, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide crónica (CML), mieloma múltiple, policitemia vera, trombocitosis esencial, mielofibrosis primaria o idiopática, mielosclerosis primaria o idiopática, tumores derivados de mieloides, tumores que expresan SIRPA, cáncer de tiroides, infecciones, herpes del CNS, infecciones parasitarias, infección por Tripanosoma (sic), infección por Cruzi (sic), infección por Pseudomonas aeruginosa, infección por Leishmania donovani, infección por estreptococo del grupo B, infección por Campilobacter jejuni, infección por Neisseria meningiditis, HIV tipo I, y Haemophilus influenza, de acuerdo con cualquiera de los métodos de esta divulgación. En algunas realizaciones, las instrucciones incluyen instrucciones para el uso del anticuerpo anti-SIRPA y el segundo agente (*por ejemplo*, segundo agente farmacéuticamente activo).

La presente divulgación se comprenderá más completamente a través de la referencia a los siguientes Ejemplos. Sin embargo, ellos no deberían interpretarse como limitando el alcance de la presente divulgación. Todas las citas a lo largo de la divulgación se encuentran expresamente incorporadas por la presente como referencia.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente a modo de ilustración y no a modo de limitación. Los expertos en la técnica fácilmente reconocerán una variedad de parámetros que podrán cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

Ejemplo 1: Producción de anticuerpos anti-SIRPA

La secuencia de aminoácidos de la proteína SIRPA de humano se expone a continuación en SEQ ID NO: 1. SIRPA de humano contiene un péptido señal situado en los residuos amino 1-30 de SEQ ID NO: 1. SIRPA de humano contiene un dominio extracelular tipo variable similar a la inmunoglobulina (IgV) situado en los residuos amino 32-137 de SEQ ID NO: 1; secuencias adicionales de dominio extracelular de tipo constante similar a la inmunoglobulina (IgC) situadas en los residuos amino 148-247 y 254-348 de SEQ ID NO: 1; un dominio transmembrana situado en los residuos amino 374-394 de SEQ ID NO: 1; y un dominio intracelular situado en los residuos amino 395-504 de SEQ ID NO: 1.

Secuencia de aminoácidos de SIRPA v1 de humano (SEQ ID NO: 1):

10	20	30	40	50
MEPAGPAPGR	LGPLLCLLLA	ASCAWSGVAG	EEELQVIQPD	KSVLVAAGET
60	70	80	90	100
ATLRCTATSL	IPVGPIQWFR	GAGPGRELII	NQKEGHFPRV	TTVSDLTKRN
110	120	130	140	150
NMDFSIRIGN	ITPADAGTII	CVKFRKGSPD	DVEFKSGAGT	ELSVRAKPSA
160	170	180	190	200
PVVS GPAARA	TPQHTVSFTC	ESHGFSPRDI	TLKWFKNGNE	LSDFQTNVDP
210	220	230	240	250
VGESVSISIH	STAKVVLTRE	DVHSQVICEV	AHVTLQGDPL	RGTANLSETI
260	270	280	290	300
RVPPTLEVTQ	QPVRAENQVN	VTCQVRKFIP	QRLQLTWLEN	GNVSR TETAS
310	320	330	340	350
TVTENKDGTI	NWMSWLLVNV	SAHRDDVKLT	CQVEHDGQPA	VSKSHDLKVS
360	370	380	390	400
AHPKEQGSNT	AAENTGSNER	NIIIVGVVC	TLLVALLMAA	LILVRIRQKK
410	420	430	440	450
AQGSTSSTRL	HEPEKNAREI	TQDTNDITIA	DLNLPKGKKP	APQAAEPNNH
460	470	480	490	500
TEIASIQTSP	QPASEDTLTI	ADLDMVHLNR	TPKQPAPKPE	PSFSEIASVQ

VPRK

Los análisis de la estructura cristalina de los complejos SIRPA-CD47 resuelven el sitio de unión a ligandos a los bucles variables que unen las hebras de hoja β en el dominio IgV de SIRPA. La interfaz de unión CD47 consta de los residuos de aminoácidos S59-P65, L96-F104, y K123-D130 de SIRPA.

Se han identificado múltiples polimorfismos de SIRPA en humanos. Dado que la mayoría de las variaciones en secuencia yacen más allá del sitio de unión a ligandos CD47, la mayoría de las variantes de SIRPA examinadas parecen unirse a CD47 con afinidades similares. Otro miembro de la familia SIRP, SIRPB1, comparte una alta homología de secuencia con SIRPA pero falla en la unión a CD47. Una única sustitución A57M es suficiente para reorganizar la interfaz de unión a ligando S59-P65 para evitar que SIRPB1 se una a CD47. Más aún, la interacción SIRPA-CD47 es altamente específica de la especie. SIRPA de humano falla en unirse a CD47 de ratón o rata o vaca (entre las especies evaluadas) y CD47 humano solamente reconoce una única variante alélica de SIRPA de ratón expresada por medio de la cepa de ratones NOD.

El análisis BLAST de proteínas de secuencias de SIRPA a partir múltiples especies muestra un grado significativo de identidad con SIRPA de humano (**FIG. 1**). La alta homología de secuencia dentro de la familia SIRP presenta un desafío significativo en la generación de anticuerpos SIRPA-específicos mientras que aún mantiene la reactividad cruzada a antígenos de SIRPA no humano.

Ejemplo 2: Caracterización del anticuerpo anti-SIRPA humanizado

El anticuerpo SIRPA de ratón m3F9 abordado en la presente, el cual contiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5.

Las **Tablas 4 y 5** a continuación enumeran secuencias de aminoácidos de región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada derivadas de hibridoma de anticuerpo anti-SIRPA murino, m3F9, así como también las correspondientes secuencias humanizadas (referidas como “h3F9”). La primera secuencia de anticuerpos humanizada para el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-SIRPA 3F9 (h3F9-H1) es una “CDR-intercambio” sin cambios para la secuencia marco humana.

La subsiguiente secuencia de región variable de cadena pesada humanizada (h3F9-H2) tiene residuos marco alterados en ciertas uniones de CDR. (Véase la **FIG. 2A**). La **FIG. 2A** enumera potenciales secuencias humanizadas del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-SIRPA 3F9. La secuencia humanizada se basa en el marco aceptor de IGHV3-23*01 y la región de unión de IGHJ4*01.

La primera secuencia humanizada para el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-SIRPA 3F9 (h3F9-L1) es un “CDR-intercambio” del dominio variable de cadena ligera sin cambios para la secuencia humana. Las subsiguientes secuencias de región variable de cadena ligera humanizadas alteran ciertos residuos marco de aminoácidos (h3F9-L2 y h3F9-L3). (Véase la **FIG. 2B**). La **FIG. 2B** enumera potenciales secuencias humanizadas del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-SIRPA 3F9.

La secuencia humanizada se basa en el marco aceptor IGKV3-11*01 y en la región de unión IGKJ2*01. Las secuencias de CDR están indicadas en negrita. Las definiciones de CDR son AbM a partir del sitio web www.bioinf.org.uk/abs/. “b” indica cadena lateral enterrada; “p” indica parcialmente enterrada; “i” indica cadena lateral en la interfaz entre los dominios VH y VL. Las diferencias de secuencia entre las líneas germinales humanas y murinas se indican a través del asterisco (*). Las potenciales mutaciones adicionales en los marcos se indican

bajo la secuencia. Los cambios potenciales en las secuencias de CDR se indican bajo cada secuencia de CDR. Éstos pueden evitar la desamidación de asparagina (N). Todas las seis diferentes versiones humanizadas del anticuerpo anti-SIRPA 3F9 (en base a las siguientes combinaciones de regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera: h3F9-H1/L1; h3F9-H1/L2; h3F9-H1/L3; h3F9-H2/L1; h3F9-H2/L2; y h3F9-H2/L3) se injertaron sobre una columna vertebral de IgG4 humana, producida de modo recombinante en las células CHO-K1, y caracterizada además según se describe a continuación.

TABLA 4

Anticuerpo	Secuencias de región variable de cadena pesada	SEQ ID NO:
m3F9 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSIAMSWVRQTPEKRL EWWATISDIGGSITIIPDSVKGRFTISRDNKAITLILQMSSLRSEDAL IICARPPIDDIIGGFAIWGQGTLVTVSA	2
h3F9-H1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSIAMSWVRQAPGKG LEWVSTISDIGGSITIIADSVKGRFTISRDN SKNTLILQMNSLRAEDT AVIICAKPPIDDIIGGFAIWGQGTLVTVSS	3
h3F9-H2	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSIAMSWVRQAPGKG LEWVATISDIGGSITIIADSVKGRFTISRDN SKNTLILQMNSLRAEDT AVIICARPPIDDIIGGFAIWGQGTLVTVSS	4

TABLA 5

Anticuerpo	Secuencias de región variable de cadena ligera	SEQ ID NO:
m3F9 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSSGISIMHWIQQKPG	5

	QPPKLLIILASNLESGVPARFSGSGSGDFTLNIHPVEEEDAATIIC QHNRELPCTFGGGTKLEIK	
h3F9-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASKSVSSSGISIMHWIQQKPG KAPKLLIILASNLESGVPSRFSGSGSGDFTLTISLQPEDFATIIC QHNRELPCTFGQGTKLEIK	6
h3F9-L2	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRASKSVSSSGISIMHWIQQKPG KAPKLLIILASNLESGVPSRFSGSGSGDFTLTISVQPEDFATIIC QHNRELPCTFGQGTKLEIK	7
h3F9-L3	DIQLTQSPSSLSVSVGDRATITCRASKSVSSSGISIMHWIQQKPG KAPKLLIILASNLESGVPSRFSGSGSGDFTLTISVQPEDFATIIC QHNRELPCTFGQGTKLEIK	8

Las mediciones de afinidad para los anticuerpos anti-SIRPA se llevaron a cabo como sigue. Los datos de la interferometría de biocapa (BLI) se recogieron sobre un instrumento Pall ForteBio Octet RED96. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el Software de Análisis de Datos ForteBio, versión 9.0. Se utilizó tampón cinético estándar (PBS, 0,1% BSA, 0,02% Tween-20, pH 7,2) para el ensayo y para preparar los reactivos. Después de equilibrar al sensor en el tampón, cada uno de los anticuerpos anti-SIRPA 3F9 humanizados (2,5 µg/mL, tiempo de carga 300 s) se capturó sobre Biosensores de Captura Inmersión y Lectura de Anti- IgG Humana Fc (Pall ForteBio, Menlo Park, CA). Luego las concentraciones variables (0 – 200 nM) de SIRPA de humano marcado con histidina (Sino Biological, Beijing, China) se unieron a la superficie anti-SIRPA capturada (tiempo de asociación 300 s, tiempo de disociación 600 s). La señal de BLI resultante se obtuvo como la diferencia en la respuesta a partir del sensor de referencia (2,5 µg/mL IgG + 0 nM SIRPA). Un control de ligando cero (0 µg/mL IgG + 200 nM SIRPA) mostró una unión de SIRPA no específica no mensurable para la superficie de la punta del sensor. Las mediciones de la afinidad para el

anticuerpo m3F9 parental se llevaron a cabo utilizando un método similar, excepto con el anticuerpo capturado sobre biosensores de Anti-IgG de Ratón Fc. Se llevó a cabo un análisis cinético de multi-concentración utilizando un modelo de interacción 1:1 para extraer las constantes de velocidad de asociación y disociación (k_a y k_d , respectivamente) para cada anticuerpo. Las constantes de afinidad de unión (KD) se calcularon a partir de la relación k_d/k_a .

Los anticuerpos inmovilizados de anti-IgG de ratón Fc o anti-IgG de humano Fc capturaron anticuerpo anti-SIRPA 3F9 murino y anticuerpo anti-SIRPA 3F9 humanizado sobre los biosensores, respectivamente. Concentraciones en aumento de isoforma huSIRPA marcada con histidina 1 (10-500 nM) fluyeron sobre el anticuerpo anti-SIRPA 3F9 capturado para registrar las trazas. Se analizaron las trazas de mejor ajuste a partir de los sensorgramas resultantes para calcular la velocidad de asociación, la velocidad de disociación, y los valores de afinidad. Las tres variantes de anticuerpo anti-SIRPA 3F9 humanizado evaluadas fueron mAb 14.70.1 (secuencia variable de cadena pesada de SEQ ID NO:3 y secuencia variable de cadena ligera de SEQ ID NO:6), mAb 14.70.2 (secuencia variable de cadena pesada de SEQ ID NO:3 y secuencia variable de cadena ligera de SEQ ID NO:7), y mAb 14.70.4 (secuencia variable de cadena pesada de SEQ ID NO:4 y secuencia variable de cadena ligera de SEQ ID NO:6). Las cinéticas de unión medidas de los anticuerpos anti-SIRPA 3F9 humanizados se sintetizan en la **Tabla 6** a continuación, como los valores extraídos de k_a , k_d , y KD. De las seis variantes de h3F9 producidas, 3 anticuerpos anti-SIRPA (mAb 14.70.1: H1/L1; mAb 14.70.2: H1/L2; mAb 14.70.4: H2/L1) presentaron afinidades similares al antígeno de SIRPA soluble como el anticuerpo anti-SIRPA m3F9 parental (secuencia variable de cadena pesada de SEQ ID NO:2 y secuencia variable de cadena ligera de SEQ ID NO:5).

TABLA 6

Clon de Anticuerpo 3F9	Kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	KD (nM)
m3F9 IgG1 parental	5,08E+04	1,00E-03	18
mAb 14.70.1	1,10E+05	2,00E-03	19
mAb 14.70.2	1,10E+05	2,20E-03	20
mAb 14.70.4	8,60E+04	9,40E-04	11

Además de la unión al antígeno soluble, también se llevaron a cabo mediciones de afinidad basadas en células para comprobar las aparentes afinidades de los anticuerpos anti-SIRPA h3F9 en relación con anticuerpo anti-SIRPA m3F9 al antígeno de SIRPA v1 unido por membrana. Los valores de EC50 asignan una afinidad relativa mediante la adición de concentraciones en aumento de anticuerpos anti-SIRPA 3F9 a células BWZ que sobreexpresan SIRPA de humano. Los anticuerpos unidos a receptores se detectaron a través de la tinción de células con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón Fc APC o anti-IgG de humano PE. Se adicionaron diluciones seriadas de anticuerpos monoclonales a células 10⁵ BWZ que sobreexpresan huSIRPA (BWZ-huSIRPA) y se dejó que logre el equilibrio de unión a 4°C. Después de la adición de anticuerpo secundario marcado por fluorescencia y de breves etapas de lavado, se registraron por medio de análisis FACS los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) como una función de la concentración de anticuerpo titulado. Las curvas se ajustaron utilizando análisis de regresión no lineal con software Graphpad Prism 6. Los experimentos de titulación basados en células con los anticuerpos anti-SIRPA h3F9 mAb 14.70.1, mAb 14.70.2, y mAb 14.70.4 produjeron valores de EC50 de 1,065 nM, 0,9682 nM, y 1,607 nM, respectivamente. Los anticuerpos anti-SIRPA 3F9 humanizados produjeron valores de EC50 más bajos que el anticuerpo anti-SIRPA m3F9 (EC50 = 2,1 nM), mostrando una mejorada afinidad de unión de los

anticuerpos humanizados en relación con aquella determinada para el anticuerpo anti-SIRPA 3F9 murino.

También se llevó a cabo un ensayo basado en competición para calcular los valores de IC₅₀ de los anticuerpos anti-SIRPA, donde se adicionaron concentraciones en aumento de anticuerpos anti-SIRPA 3F9 humanizados y murinos a células BWZ-huSIRPA v1 para desplazar un anticuerpo de referencia marcado con fluoróforo. Los valores de IC₅₀ proporcionan otra comparación de afinidad relativa. En un ensayo basado en competición, se adicionaron concentraciones en aumento de anticuerpos anti-SIRPA 3F9 a células que expresan huSIRPA para desplazar un anticuerpo de referencia marcado con fluoróforo. Los valores de IC₅₀ se determinaron en ser como sigue: m3F9 = 11,54 nM; mAb 14.70.1 = 3,303 nM; mAb 14.70.2 = 2,185 nM; mAb 14.70.4 = 4,606 nM). Estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-SIRPA humanizados de la presente divulgación fueron competidores más efectivos contra el anticuerpo anti-SIRPA m3F9 de referencia que se une a SIRPA.

La capacidad de los anticuerpos anti-SIRPA h3F9 para reducir la expresión de la superficie celular de SIRPA se evaluó en los macrófagos humanos primarios (huMacs). Se aislaron monocitos humanos a partir de sangre periférica de donantes saludables y se diferenciaron dentro de los macrófagos *in vitro* por medio de medios de crecimiento suplementarios con M-CSF de humano. Luego de la diferenciación, se cosecharon y sembraron huMacs sobre placas de cultivo tisular de 96 pocillos con una concentración en aumento de control de isotipo o anticuerpos anti-SIRPA solubles y se incubó durante la noche a 37°C. Las células se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de superficie de SIRPA utilizando un anticuerpo anti-SIRPA de humano conjugado con DyLight650 (clon SA56) que pertenece a una bandeja de epítopos separados que la del anticuerpo anti-SIRPA 3F9. Según se muestra en la **FIG. 3**, las variantes de

anticuerpo anti-SIRPA h3F9 (mAb 14.70.1 (70,1), mAb 14.70.2 (70,2), y mAb 14.70.4 (70,4)) regularon hacia abajo los niveles de expresión del receptor de SIRPA en los macrófagos en una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, el anticuerpo anti-SIRPA m3F9 parental presentó una mayor regulación hacia abajo máxima del receptor que los anticuerpos humanizados a pesar de las similares propiedades de unión a antígeno planteadas anteriormente. Estos resultados sugirieron que las propiedades del anticuerpo anti-SIRPA más allá del acoplamiento con el receptor determinan la actividad funcional del anticuerpo anti-SIRPA 3F9 sobre los macrófagos.

Ejemplo 3: Los anticuerpos anti-SIRPA requieren a los receptores Fc gamma (FcγRs) para la actividad funcional

Una diferencia principal entre los anticuerpos anti-SIRPA 3F9 de humanos y murinos es la capacidad para acoplarse con los receptores Fc gamma (FcγRs). Se injertaron anticuerpos anti-SIRPA humanizados sobre una columna vertebral de IgG4 de humano Fc conocida por poseer escasas propiedades de unión a FcγR. El hibridoma del anticuerpo anti-SIRPA m3F9, a pesar de ser un anticuerpo IgG1 murino, aún mantiene la actividad de unión hacia ciertos FcγRs humanos. Para verificar que los FcγRs modulan la actividad funcional de los anticuerpos anti-SIRPA, se trató anticuerpo anti-SIRPA m3F9 con EndoS para remover enzimáticamente el glicano Fc sobre Asn297, una interacción determinante clave en la mediación de IgG-FcγR. Se trataron macrófagos humanos primarios a partir 2 donantes saludables durante la noche con concentraciones en aumento de anticuerpo anti-SIRPA m3F9 glicosilado o desglicosilado. Las células subsiguientemente se tiñeron con un anticuerpo anti-SIRPA de referencia conjugado con DyLight650 (SA56-DiL650) que se une a una

distinta bandeja de epítomos y se analiza luego para la expresión de superficie de SIRPA a través de análisis FACS.

Según se muestra en la **FIG. 4A**, ambas glicoformas de anticuerpo anti-SIRPA m3F9 significativamente regularon hacia abajo la expresión de superficie celular de SIRPA. Sin embargo, en ambos donantes, la variante de anticuerpo anti-SIRPA m3F9 desglicosilada presentó una actividad máxima reducida en comparación con aquella observada para la forma glicosilada del anticuerpo. En particular, el anticuerpo anti-SIRPA m3F9 glicosilado reguló hacia abajo la expresión de SIRPA en tanto como 90% y 85% en el Donante (Dnr) 413 y en el Donante 414, respectivamente; mientras que el anticuerpo anti-SIRPA m3F9 desglicosilado solamente logró 70% y 75% de regulación hacia abajo del receptor de SIRPA en los mismos macrófagos donantes, respectivamente. Este hallazgo sugirió que los anticuerpos anti-SIRPA, específicamente el anticuerpo m3F9, requiere el acoplamiento con FcγR para una mejorada regulación hacia abajo de la expresión de la superficie celular de SIRPA. Los resultados en la **FIG. 4A** se presentan como el porcentaje de unión del anticuerpo de referencia mediante la división del valor de MFI de las muestras tratadas con anticuerpos anti-SIRPA por el valor de MFI de las muestras tratadas con el control de isotipo.

Además de la regulación hacia abajo del receptor mediada por anticuerpo según se divulgó anteriormente, se evaluó el rol de los FcγRs en el mejoramiento mediado por anticuerpo anti-SIRPA 3F9 de la fagocitosis de las células tumorales. Se llevó a cabo un ensayo de fagocitosis de las células tumorales basado en fluorescencia con pHrodo. Se trataron macrófagos humanos primarios durante la noche con anticuerpo de control de isotipo (MOPC) o variantes indicadas de anticuerpo anti-SIRPA 3F9. Se adicionaron células Raji marcadas con tinte pHrodo a los macrófagos y se incubaron a 37°C durante 2 horas. La Avidina Roja (Red Avidin) (Invitrogen) es una molécula de estreptavidina conjugada con tinte

Rojo de pHrodo, un marcador fluorogénico que adquiere fluorescencia en medioambientes ácidos, tales como el fagosoma. Para focalizarse en el marcado de las células tumorales, se mezcló 500 nM Avidina Roja con 15 nM Lens Culinaris Agglutinin biotinilado (LCA; Vector Labs). Luego los complejos de Avidina Roja-LCA se mezclaron en una relación volumétrica 1:1 con 400.000 células Raji en medios RPMI libres de suero sobre hielo. Las propiedades de unión a los azúcares de LCA unen a la Avidina Roja con la estructura de carbohidratos sobre la superficie de las células tumorales. Luego de breves etapas de lavado, se mezclaron Avidina Roja-LCA-células Raji marcadas con macrófagos humanos derivados de monocitos en medios RPMI libres de suero y se incubó a 37°C durante 2 horas. Luego los macrófagos se recolectaron y se tiñeron sobre hielo con anti-CD14 APC en tampón FACS conteniendo anticuerpos de bloqueo de FcγR. Se midió la actividad fagocítica mediante el conteo del porcentaje de macrófagos doble positivo CD14/pHrodo. Como un control, se mezclaron células Raji no marcadas con los macrófagos para establecer los niveles de fluorescencia de fondo. Los resultados en la **FIG. 4B** se presentan como el aumento en veces en el porcentaje de la población de macrófagos doble positivo pHrodo/CD14.

Según se muestra en la **FIG. 4B**, los macrófagos tratados durante la noche con anticuerpo anti-SIRPA m3F9 glicosilado desplegaron un aumento de ~2 veces en la fagocitosis de las células tumorales en relación con aquél observado que utilizó macrófagos tratados con anticuerpos de control de isotipo. Los macrófagos tratados con anticuerpo anti-SIRPA m3F9 desglicosilado desplegaron un aumento de ~1,5 veces en la fagocitosis de las células tumorales en relación con los macrófagos tratados con control de isotipo. Este aumento de ~1,5 veces en la fagocitosis de las células tumorales representa una estadísticamente significativa disminución de ~50% en la actividad en relación con aquélla observada con el

anticuerpo anti-SIRPA m3F9 glicosilado. Más aún, los macrófagos tratados con h3F9 IgG4 (mAb 14.70.1 o mAb 14.70.2) no desplegaron ninguna capacidad para mejorar la fagocitosis de las células tumorales por encima de los niveles de línea de base.

Estudios previos establecieron una correlación entre la mejorada actividad fagocítica y la regulación hacia abajo de CD14 tras la estimulación de los macrófagos con anticuerpo anti-SIRPA 3F9. Para determinar si esta correlación también depende, al menos en parte, de los FcγRs, se trataron macrófagos humanos primarios durante la noche con cualquiera de las variantes de anticuerpo anti-SIRPA IgG4 m3F9 o h3F9 glicosilado (mAb 14.70.1, mAb 14.70.2, y mAb 14.70.4) y se ensayaron para la fagocitosis de las células tumorales y la expresión de CD14. Según se muestra en la **FIG. 5A**, solamente los macrófagos tratados con anticuerpo anti-SIRPA 3F9 mostraron una mejorada fagocitosis de las células Raji en relación con aquella observada con macrófagos tratados con anticuerpo de control de isotipo. Los resultados se presentan como el aumento en veces en el porcentaje de la población de macrófagos doble positivo pHrodo/CD14. Los anticuerpos anti-SIRPA IgG4 humanizados fallaron en mejorar la fagocitosis de las células Raji. Asimismo, solamente la estimulación del anticuerpo anti-SIRPA 3F9 reguló hacia abajo la expresión de CD14 sobre los macrófagos, mientras que las variantes de anticuerpo anti-SIRPA IgG4 h3F9 no alteró la expresión de CD14 (**FIG. 5B**). Además de apoyar una correlación entre el nivel de expresión de CD14 y la actividad fagocítica en los macrófagos, estos resultados confirmaron que la actividad funcional del anticuerpo anti-SIRPA 3F9 depende, al menos en parte, de los FcγRs.

Ejemplo 4: Regulación hacia abajo de CD32 por los anticuerpos anti-SIRPA

Además del antígeno blanco de interés, las células del linaje mieloide también expresan múltiples receptores Fc capaces de unirse al dominio Fc de los anticuerpos terapéuticos. Los receptores Fc gamma (FcγR) constituyen la clase de receptores mejor caracterizada y más potente para mediar las funciones efectoras dependientes de Fc. Los FcγRs constan de ambos receptores de activación asociados a ITAM (CD64/FcγRI, CD32A/FcγRIIA, y CD16A/FcγRIIIA) y un receptor inhibidor portador de ITIM (CD32B/FcγRIIB), y la coexpresión de los receptores de activación/inhibidores sobre la misma célula establece un límite para la activación celular. En general, la ligadura de los FcγRs de activación por parte de los complejos inmunes inicia diversas cascadas de señalización que conducen a la activación celular y a la subsiguiente inducción de funciones efectoras. Estas actividades varían entre los tipos de células mieloides, pero pueden incluir a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, a la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos, y a la regulación hacia arriba de diversas citoquinas y quimiocinas proinflamatorias, etc. En contraste, la ligadura del receptor inhibidor, FcγRIIB, por parte de complejos inmunes contrarresta las señales inmunoestimuladoras de los FcγRs de activación que soportan el mantenimiento de la homeostasis tisular. Por ejemplo, diversos estudios establecen que la desactivación genética de FcγRIIB resulta en la mejorada actividad proinflamatoria de macrófagos en modelos murinos de inflamación mediada por complejos inmunes. Dado que FcγRIIB es el único FcγR con actividad inhibidora, éste juega un rol central en la regulación de la inflamación mediada por FcγR por parte de las células mieloides. En el contexto del microambiente del tumor, los niveles de expresión de FcγRIIB pueden determinar el estado de polarización de los macrófagos asociados a tumores y la regulación de la función efectora de macrófagos *in vivo*.

Para determinar cuál FcγR contribuye a la actividad *in vitro* del anticuerpo anti-SIRPA 3F9, se trataron macrófagos derivados de monocitos obtenidos a partir de dos donantes saludables durante la noche ya sea con anticuerpo de control de isotipo o anticuerpo anti-SIRPA m3F9 y luego se evaluaron para los niveles de expresión de superficie de FcγRIIIA (CD16), FcγRI (CD64), y FcγRIIA/B (CD32A/B). Según se muestra en la **FIG. 6A**, el tratamiento con anticuerpo anti-SIRPA 3F9 redujo sustancialmente la expresión de superficie de CD32A/B en relación con aquella observada en los macrófagos tratados con anticuerpo de control de isotipo. Dado que el anticuerpo de detección utilizado para medir los niveles de superficie de FcγRII (clon FUN-2; Biolegend) no distingue entre el receptor de activación FcγRIIA y el receptor inhibidor FcγRIIB, este ensayo se repitió con anticuerpos específicos del receptor. Según se describió previamente, se trataron macrófagos derivados de monocitos obtenidos a partir de dos donantes saludables durante la noche ya sea con anticuerpo de control de isotipo o la variante de anticuerpo anti-SIRPA 3F9 indicada. La **FIG. 6B** muestra que el anticuerpo anti-SIRPA m3F9 significativamente reguló hacia abajo a FcγRIIA en los macrófagos en ~70-85% en relación con aquello observado en las células tratadas con anticuerpo de control de isotipo. Este efecto fue dependiente del dominio Fc puesto que ambos variante IgG4 h3F9 (mAb 14.70.2) y forma deglicosilada del anticuerpo murino anularon la regulación hacia abajo de FcγRIIA.

Cuando se evalúa la expresión de superficie de FcγRIIB, el tratamiento con anticuerpo anti-SIRPA m3F9 redujo la expresión del receptor inhibidor hasta cerca de niveles indetectables en relación con aquello observado en los macrófagos tratados con anticuerpo de control de isotipo (**FIG. 6B**). En contraste, no fue evidente una significativa regulación hacia abajo de FcγRI/CD64 o FcγRIIIA/CD16A sobre los macrófagos tratados con anticuerpo anti-SIRPA 3F9 en

relación con las células tratadas con control de isotipo, indicando que el tratamiento con anticuerpo anti-SIRPA 3F9 no altera la expresión de CD16 y CD64 en los macrófagos humanos primarios (los datos no se muestran).

Para confirmar que se requiere CD32A/B para la actividad funcional del anticuerpo anti-SIRPA m3F9, se llevaron a cabo experimentos de bloqueo selectivo de FcγR para evaluar el rol de los FcγRs individuales en la fagocitosis de las células tumorales y la regulación hacia abajo de SIRPA mediada por anticuerpos. En los experimentos de bloqueo, se preincubaron macrófagos humanos primarios a partir de dos donantes sanos con los anticuerpos de bloqueo anti-CD16 o anti-CD32A/B durante 15 minutos sobre hielo. Subsiguientemente, las células se incubaron durante la noche ya sea con control de isotipo (MOPC21) o anticuerpos anti-SIRPA m3F9. Se detectó la expresión de SIRPA con anticuerpo anti-SIRPA de referencia conjugado con DyLight650 (SA56-DiL650). Los resultados se presentan como porcentaje de unión de anticuerpo de referencia mediante la división del valor de MFI de las muestras tratadas con anticuerpos anti-SIRPA por el valor de MFI de las muestras tratadas con el control de isotipo. Según se muestra en la **FIG. 7A**, el bloqueo de CD16 no interrumpió la regulación hacia abajo de SIRPA siguiendo al tratamiento con anticuerpo anti-SIRPA m3F9 en relación con aquéllo observado en los macrófagos no tratados con anticuerpos de bloqueo FcγR. En contraste, la regulación hacia abajo de SIRPA mediada por m3F9 se deterioró significativamente en los macrófagos preincubados con anticuerpos de bloqueo anti-CD32A/B.

Para comprobar si el bloqueo CD32A/B también impide la fagocitosis, macrófagos humanos primarios se preincubaron con anticuerpo de bloqueo anti-CD32A/B y se trataron durante la noche con anticuerpo de control de isotipo o anticuerpo anti-SIRPA m3F9. Se mezclaron células Raji marcadas con tinte

pHrodo con los macrófagos y se incubó a 37°C durante 2 horas. Los resultados se presentan como el aumento en veces en el porcentaje de la población de macrófagos doble positivo pHrodo/CD14. Según se muestra en la **FIG. 7B**, los macrófagos tratados con m3F9 a partir de ambos donantes mejoraron la fagocitosis de las células Raji ~2 veces en relación con aquello observado en los macrófagos tratados con anticuerpo de control de isotipo. Sin embargo, el bloqueo de CD32A/B ya sea parcialmente o por completo bloqueó el mejoramiento de la fagocitosis de las células tumorales mediado por m3F9. Tomados en conjunto, estos resultados establecieron que el acoplamiento de CD32A/B se requiere funcionalmente para la actividad del anticuerpo anti-SIRPA m3F9.

Ejemplo 5: La Maduración de la Afinidad de anticuerpos anti-SIRPA h3F9

Se llevó a cabo la maduración de la afinidad de anticuerpo anti-SIRPA 3F9 humanizado. Brevemente, ciertos residuos de aminoácidos en la cadena pesada o ligera se mutagenizaron selectivamente y los mutantes que mejoraron la unión se seleccionaron a través de rondas de cribado adicionales. Este proceso simultáneamente mejora la especificidad, la reactividad cruzada de las especies, y los perfiles de capacidad de desarrollo, posibilitando el ajuste preciso de las propiedades involucradas en el mecanismo de acción, potencia en los ensayos biológicos, y modelado preclínico deseados. Las caracterizaciones incluyeron diversos ensayos de capacidad de desarrollo, unión celular y mediciones de afinidad de Forte Bio y MSD. Después de la primera ronda de maduración de la afinidad, los anticuerpos con afinidad mejorada también desplegaron una mejorada reactividad poliespecífica (PSR), la cual se usa para determinar la unión no específica del anticuerpo. De este modo, se llevó a cabo una segunda ronda de maduración de la afinidad para mejorar la afinidad sin elevar la PSR.

Secuencias de dominio variable de cadena pesada y ligera de anticuerpos

Utilizando técnicas estándar, se determinaron las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena ligera y de los dominios variables de cadena pesada de los anticuerpos de afinidad madurada descritos en la presente. Las secuencias HVR de cadena ligera de los anticuerpos se exponen en la **Tabla 7-8**. Las secuencias HVR de cadena ligera de los anticuerpos se exponen en la **Tabla 7**. Las secuencias HVR de cadena pesada de los anticuerpos se exponen en la **Tabla 8**. Las secuencias marco (FR) de cadena ligera y de cadena pesada de los anticuerpos se exponen en la **Tabla 9**. Las secuencias de región variable de cadena pesada y de región variable de cadena liviana de los anticuerpos se exponen a continuación en la **Tabla 10**.

TABLA 7

Secuencias HVR de cadena ligera de anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada

		SEQ ID NO:	mAb ID (3F9-#)
HVR-L1	RASKSVSSGGISIMH	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, y 25
HVR-L2	LASNLES	10	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, y 25
HVR-L3	QHNRELPST	11	1, 10, y 18
	QHNRELPCT	12	2
	QHNRELPIT	13	3, 11, y 19
	QHNRELPPT	14	4, 12, y 20
	QHNRELPTT	15	5, 13, y 21
	QHNRELPVT	16	6, 14, y 22
	QHNRELPAT	17	7, 15, y 23
	QHNRELPGT	18	8, 16, y 24
	QHNRELPWT	19	9, 17, y 25

Tabla 8
Secuencias HVR de cadena pesada de anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada

		SEQ ID NO:	mAb ID (3F9-#)
HVR-H1	GFTFSSIAMS	20	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, y 25
HVR-H2	TISEIGGSITIIAESVKG	21	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, y 25
HVR-H3	PPIDDIIGGF AI	22	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9
	PPIDDIIGGF RI	23	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, y 17
	PPIDDIIGGF QI	24	18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, y 25

TABLA 9
Secuencias Marco de cadena pesada y ligera de anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada

FR	VH	SEQ ID NO:	VL	SEQ ID NO:
FR 1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAAS	25	DIQLTQSPSSLSASVGDR VTITC	29
FR 2	WVRQAPGKGLEWVA	26	WIQQKPGKAPKLLII	30
FR 3	RFTISRDNSKNTLILQMNSLR AEDTAVIICAR	27	GVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSVQPEDFATIIC	31
FR 4	WGQGT LVT VSS	28	FGQG TKLEIK	32

TABLA 10

Región Variable de Cadena Pesada		
	SEQ ID NO:	mAb ID (3F9-#)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAESVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPY DDYYGGFAYWGQGT LVT VSS	33	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAESVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPY	34	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, y 17

DDYYGGFRYWGGQTLVTVSS		
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAESVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPY DDYYGGFQYWGGQTLVTVSS	35	18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, y 25
Región Variable de Cadena Ligera		
	SEQ ID NO:	mAb ID (3F9-#)
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSSGGY SYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELPSTF GQGTKLEIK	36	1, 10, y 18
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSSGGY SYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELPCTF GQGTKLEIK	37	2
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSSGGY SYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELPITF GQGTKLEIK	38	3, 11, y 19
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSSGGY SYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELPPTF GQGTKLEIK	39	4, 12, y 20
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSSGGY SYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELPPTF GQGTKLEIK	40	5, 13, y 21
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSSGGY SYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELPVTF GQGTKLEIK	41	6, 14, y 22
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSSGGY SYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELPATF GQGTKLEIK	42	7, 15, y 23
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSSGGY SYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELPGTF GQGTKLEIK	43	8, 16, y 24
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSSGGY SYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISVQPEDFATYYCQHNRELPWTF GQGTKLEIK	44	9, 17, y 25

Ejemplo 6: Caracterización de anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada

La caracterización inicial de los anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada divulgados en la presente comprendió la adquisición de mediciones de

afinidad a antígenos utilizando interferometría de biocapa (BLI) sobre un instrumento Pall ForteBio Octet RED96. Los anticuerpos inmovilizados de anti-IgG de ratón Fc o anti-IgG de humano Fc capturaron anticuerpo anti-SIRPA 3F9 murino y anticuerpo anti-SIRPA 3F9 humanizado sobre los biosensores, respectivamente.

Se llevó a cabo cinética de ciclo único con 25 nM huSIRPA [¿cuál variante?] -sic- o 50 nM huSIRPB1 fluyó sobre el anticuerpo 3F9 capturado para registrar las trazas. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el Software de Análisis de Datos ForteBio, versión 9.0. Se utilizó tampón cinético estándar (PBS, 0,1% BSA, 0,02% Tween-20, pH 7,2) para el ensayo y para preparar los reactivos. Después de equilibrar al sensor en el tampón, se capturaron anticuerpo anti-SIRPA h3F9 (2 µg/mL, tiempo de carga 300 s) o variantes de afinidad madurada del anticuerpo anti-SIRPA h3F9 sobre Biosensores de Captura Inmersión y Lectura de Anti- IgG Humana Fc (Pall ForteBio, Menlo Park, CA). Luego 50 nM de SIRPA v1 de humano o SIRPB1 de humano marcado con histidina (Novoprotein, Summit, NJ, Estados Unidos) se unieron a la superficie recubierta de anticuerpo anti-SIRPA capturada (tiempo de asociación 200 s, tiempo de disociación 900 s). La señal de BLI resultante se obtuvo como la diferencia en la respuesta a partir del sensor de referencia (2 µg/mL 3F9 + 0 nM SIRPA). Un control de ligando cero (0 µg/mL 3F9 + 200 nM SIRPA) mostró una unión de SIRPA no específica no mensurable para la superficie de la punta del sensor. Se llevó a cabo un análisis cinético de curva simple utilizando un modelo de interacción 1:1 para extraer las constantes de velocidad de asociación y disociación (k_a y k_d , respectivamente) para cada anticuerpo. Las constantes de afinidad (K_D) se calcularon a partir de la relación k_d/k_a . Se obtuvieron sensorgramas de 25 anticuerpos de progenie anti-SIRPA y un anticuerpo parental uniéndose a huSIRPA y huSIRPB1 solubles, y se utilizaron trazas de mejor ajuste para calcular la velocidad de asociación, la

velocidad de disociación, y los valores de afinidad. Las mediciones de afinidad (k_a , k_d , y KD) derivadas a partir del análisis de ajuste de curvas de los sensorgramas obtenidos a partir de estos experimentos se sintetizan en la **Tabla 11**. Todos los anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada carecían de cualquier reactividad cruzada mensurable a huSIRPB1 (los datos no se muestran), y seis anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada (3F9-18, 3F9-12, 3F9-23, 3F9-14, 3F9-22, y 3F9-20) presentaron un aumento ~10 veces en la afinidad hacia huSIRPA soluble en relación con aquéllo observado con el anticuerpo anti-SIRPA h3F9 parental.

TABLA 11
Cinética de Unión de Anticuerpos h3F9 de Afinidad Madurada

Ab ID (3F9-#)	KD (M)	k_{on} (Ms) ⁻¹	k_{off} (s ⁻¹)
18	4,19E-10	1,37E+05	5,74E-05
12	4,29E-10	1,39E+05	5,96E-05
23	5,39E-10	1,69E+05	9,11E-05
14	6,18E-10	1,65E+05	1,02E-04
22	6,46E-10	1,74E+05	1,13E-04
20	8,50E-10	1,50E+05	1,28E-04
16	1,27E-09	1,19E+05	1,51E-04
21	1,03E-09	1,48E+05	1,52E-04
24	1,07E-09	1,44E+05	1,55E-04
25	1,06E-09	1,53E+05	1,62E-04
7	1,81E-09	9,92E+04	1,80E-04
19	1,29E-09	1,41E+05	1,81E-04
11	1,43E-09	1,34E+05	1,92E-04
6	1,65E-09	1,16E+05	1,92E-04

Ab ID (3F9-#)	KD (M)	kon (Ms)-1	koff (s-1)
13	1,38E-09	1,46E+05	2,01E-04
10	1,51E-09	1,34E+05	2,01E-04
4	1,79E-09	1,13E+05	2,03E-04
1	2,09E-09	1,06E+05	2,22E-04
2	2,06E-09	1,08E+05	2,22E-04
17	1,70E-09	1,40E+05	2,38E-04
5	2,95E-09	9,36E+04	2,76E-04
8	3,60E-09	7,66E+04	2,76E-04
9	3,38E-09	8,94E+04	3,02E-04
15	6,28E-09	5,76E+04	3,62E-04
3	4,43E-09	9,39E+04	4,16E-04
h3F9	6,48E-09	1,84E+05	1,19E-03

También se llevaron a cabo mediciones de afinidad basadas en células para comprobar las aparentes afinidades de los anticuerpos anti-SIRPA 3F9 de afinidad madurada al antígeno expresado en la superficie celular. Se adicionaron diluciones seriadas de cada uno de los anticuerpos anti-SIRPA monoclonales a células 10^5 BWZ-huSIRPA y se dejó que logre el equilibrio de unión a 4°C. Después de la adición de anticuerpo secundario marcado por fluorescencia y de breves etapas de lavado, se registraron por medio de análisis FACS los valores de MFI como una función de la concentración del anticuerpo titulado. Los valores de EC50 (enumerados a continuación) asignan una afinidad relativa mediante la adición de concentraciones en aumento de variantes de anticuerpos 3F9 a células BWZ que sobreexpresan SIRPA de humano. Los anticuerpos unidos a receptores se detectaron a través de la tinción de las células con anticuerpo secundario anti-

IgG de humano PE. Las curvas se ajustaron utilizando análisis de regresión no lineal con software Graphpad Prism 6. Los experimentos de titulación basados en células con anticuerpos anti-SIRPA murinos 3F9 y humanizados de afinidad madurada mostraron un mejoramiento de los valores de EC50 de los anticuerpos anti-SIRPA humanizados de afinidad madurada; dos anticuerpos anti-SIRPA mostraron un mejoramiento significativo en los valores de EC50 (mAb 3F9-14 = 0,42 nM y mAb 3F9-22 = 0,49 nM) en comparación con aquéllo observado con el anticuerpo anti-SIRPA mIgG1 3F9 (0,72 nM). Véase la **Tabla 12** a continuación.

TABLA 12

	3F9-14	3F9-17	3F9-18	3F9-20	3F9-21	3F9-22	3F9-25	3F9 mIgG1
EC50 (nM)	0,42	0,61	0,51	0,49	0,64	0,49	0,96	0,72

Ejemplo 7: Reactividad cruzada de anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada a variantes antigénicas de SIRPA

El dominio de unión a CD47 SIRPA de humano es altamente polimórfico, lo cual puede impedir el desarrollo de anticuerpos anti-SIRPA de bloqueo de CD47 capaces de reconocer todas las variantes alélicas de SIRPA expresadas en las poblaciones humanas. De hecho, los dos alelos más comunes de SIRPA de humano (v1 y v2) son también los más divergentes en secuencia con 13 residuos que difieren en el dominio IgV. Dado que los estudios de competición de CD47 resolvieron que el anticuerpo anti-SIRPA m3F9 se une a una región distinta del sitio de unión a ligando CD47, se llevaron a cabo ensayos de unión para verificar la reactividad cruzada entre SIRPA v1 y v2 de humano, así como también la reactividad cruzada de las especies para determinar modelos relevantes de animales para estudios de toxicología.

En un ensayo ELISA, placas Immulon HBX con 96 pocillos se recubrieron con SIRPA marcado con His o Fc de una especie determinada, según se indicó, a 1 µg/mL en PBS durante la noche a 4°C (sic). Las placas se bloquearon en 5% (p/v) albúmina sérica bovina en PBS durante 1 hora, luego de lo cual ellas se lavaron 3 veces con PBS/0,05% Tween 20 (PBS/T). Se adicionaron anticuerpos anti-SIRPA a la placa en una serie de dilución y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas, luego de lo cual el anticuerpo no unido se retiró mediante el lavado con PBS/T. Luego se adicionó a los pocillos cadena ligera Kappa anti-humana o anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch) y se incubó durante 30 minutos. El anticuerpo no unido se removió mediante el lavado con PBS/T, luego de lo cual se detectó el anticuerpo unido utilizando tetrametilbenzidina (TMB). La reacción se detuvo con 2N H₂SO₄, luego de lo cual las placas se leyeron a A450.

El anticuerpo anti-SIRPA 3F9 murino parental se une a ambas versiones v1 y v2 de SIRPA de humano-Fc con similares valores de EC₅₀ (0,695 y 0,789 nM, respectivamente). Se observa una disminución parcial en la afinidad aparente con el antígeno humano marcado por His lo cual sugiere una más avida unión al SIRPA marcado con Fc. Adicionalmente, el anticuerpo anti-SIRPA 3F9 murino parental demuestra una débil reactividad cruzada a SIRPA de cynomolgus marcado con Fc y His (EC₅₀ = 1,09 nM). No se observó unión detectable a SIRPA de rata.

Luego de la maduración de la afinidad del anticuerpo parental según se describió anteriormente, dos anticuerpos anti-SIRPA de progenie, mAb 3F9-14 y mAb 3F9-22, se cribaron contra el mismo panel de antígenos de SIRPA para evaluar la reactividad cruzada. Al igual que con el anticuerpo anti-SIRPA m3F9, ambos anticuerpos anti-SIRPA humanizado y de afinidad madurada mantuvieron la actividad de unión contra SIRPA v1 y v2 de humano pero con valores de EC₅₀

significativamente más bajos, confirmando el aumento en la afinidad observado en las mediciones de biosensores y los ensayos de unión de células descritos anteriormente. A pesar de la afinidad aumentada hacia SIRPA v1 y v2 de humano, el anticuerpo anti-SIRPA 3F9-14 presentó una débil reactividad cruzada a cynoSIRPA; las curvas de unión produjeron valores de EC50 ($EC_{50} = 0,879$ nM), similares a aquéllos observados con el anticuerpo anti-SIRPA m3F9. En contraste, el anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 demostró una equivalente actividad de unión hacia cynoSIRPA al igual que con ambas variantes de SIRPA de humano ($EC_{50} = 0,107$ nM). Ni el anticuerpo 3F9-14 ni el anticuerpo 3F9-22 se unieron a SIRPA de rata (los datos no se muestran). Las EC_{50} calculadas a partir de las curvas de unión se enumeran a continuación y establecen que todos los anticuerpos anti-SIRPA se unieron a ambas variantes alélicas de SIRPA de humano. Solamente el anticuerpo anti-SIRPA hu3F9-22 se unió a cyno SIRPA con similar afinidad a la unión con SIRPA de humano. La Tabla 13 a continuación muestra los valores de EC_{50} de los anticuerpos anti-SIRPA a diversas proteínas de SIRPA (nM).

TABLA 13

ELISA	huSIPRA v.1 CAA71403.1	huSIRPA v.2 NP542970.1	cynoSIRPA XPO15313153.1
3F9 mlgG1	0,789	0,695	1,089
3F9-14	0,093	0,080	0,879
3F9-22	0,108	0,082	0,107

Se llevaron a cabo experimentos ELISA similares para determinar los valores de EC_{50} para el anticuerpo anti-SIRPA 9C2 (Véase a continuación para las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-SIRPA 9C2) y 3F9 contra un panel de proteínas de SIRPA y SIRPB diferentes. La Tabla 14 a continuación muestra los valores de EC_{50} de estos anticuerpos anti-SIRPA a diversas proteínas de SIRP (nM).

TABLA 14

	SIRPA v2	SIRPB1-Fc iso. 1	SIRPB1-Fc iso. 3	SIRPB1-His iso. 3	CynoSIRPA	CynoSIRPB1
mAb 9C2	0,3578	n,b	0,3822	0,4251	7,439	n.b.
mAb 3F9	0,3528	n,b,	0,3188	0,4353	0,6582	n.b.

Números de acceso: CAA71403.1 (SIRPA v2); O00241.5 (SIRPB1 iso. 1); Q5TFQ8.1 (SIRPB1 iso. 3); NP_001271679.1 (cyno SIRPA); XP_005568598 (cyno SIRPB1); n.u. = no unión

Dada la alta similaridad de secuencia entre las proteínas de SIRPA a partir de múltiples especies, según se muestra en la **FIG. 1**, también se cribaron clones de progenie de anticuerpo anti-SIRPA para la reactividad cruzada contra antígenos de SIRPA adicionales a partir de diversas especies de mamíferos. SIRPA de mono tití (no. de acceso JAB51896) o SIRPA de perro (no. de acceso XP005634938) o SIRPA de conejo (no. de acceso G1U0I5) marcadas con Fc se recubrieron sobre placas y se incubaron con concentraciones en aumento del anticuerpo anti-SIRPA hu3F9-14 y hu3F9-22. Ambos anti-SIRPA mAb 3F9-14 y mAb 3F9-22 reconocieron a SIRPA de mono tití y de perro, aunque con una afinidad más baja que aquella observada con SIRPA de humano. Por ejemplo, los valores de EC50 para 3F9-14 que se une a SIRPA de mono tití y de perro fueron 1,2 nM y 0,64 nM, respectivamente. Asimismo, los valores de EC50 para 3F9-22 que se une a SIRPA de mono tití y de perro fueron 4,3 nM y 0,83 nM, respectivamente. Ni el clon de anticuerpo anti-SIRPA 3F9-14 ni tampoco el 3F9-22 se unieron a SIRPA de conejo.

Ejemplo 8: Los anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada regulan hacia abajo a SIRPA y CD32A/B

Los experimentos previos establecieron que el anticuerpo anti-SIRPA m3F9 antagonizaba de modo no competitivo a CD47 que se une a SIRPA mediante la reducción de la expresión de superficie de SIRPA, lo cual resultó en una incrementada capacidad para estimular el envolvimiento de las células tumorales por parte de los macrófagos en comparación con los anticuerpos anti-SIRPA de bloqueo de CD47. Se ensayaron anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada para el mantenimiento de propiedades funcionales similares con el anticuerpo murino.

Dado que el anticuerpo anti-SIRPA m3F9 (sobre una columna vertebral de IgG1 de ratón) reguló hacia abajo SIRPA y CD32A/B en una manera dependiente de Fc, se produjeron anticuerpos quiméricos en los cuales la secuencia Fab del anticuerpo anti-SIRPA m3F9 parental se fusionó con el dominio Fc de IgG1 humana (3F9 huIgG1) o Fc de IgG1 humana de tipo salvaje que portan a las mutaciones S267E/L328F (3F9-SELF) en la cadena pesada. Las mutaciones Fc SELF mejoran la unión a human FcγR2B/CD32B >100 veces en relación con Fc de IgG1 humana de tipo salvaje. Se aislaron monocitos humanos a partir de sangre periférica de donantes sanos y se diferenciaron *in vitro* dentro de los macrófagos con M-CSF de humano. Luego de la diferenciación, se cosecharon y se sembraron huMacs sobre placas de cultivo tisular de 96 pocillos con concentración en aumento de control de isotipo o de anticuerpos anti-SIRPA solubles y se incubó durante la noche a 37°C. Las células se analizaron a través de citometría de flujo para la expresión de superficie de SIRPA y CD32A/B utilizando un anticuerpo anti-SIRPA de humano conjugado con DyLight650 (clon SA56) y anti-CD32A/B marcado con FITC (FUN-2). Acorde con las observaciones previas, el anticuerpo anti-SIRPA 3F9 mIgG1 presentó una fuerte regulación hacia abajo dependiente de la dosis de ambos SIRPA y CD32A/B. Sin embargo, el anticuerpo anti-SIRPA 3F9 huIgG1 quimérico mostró una potencia disminuida en

la regulación hacia abajo del receptor en comparación con el anticuerpo murino (los datos no se muestran). Estos resultados proporcionaron una mayor evidencia de que el dominio Fc del anticuerpo juega un rol importante en la actividad. La ingeniería de las mutaciones SELF sobre el dominio Fc de 3F9 (3F9-SELF) quimérico restableció la capacidad para regular hacia abajo SIRPA y CD32A/B hasta niveles similares a los observados con el anticuerpo anti-SIRPA 3F9 mIgG1. Este resultado confirma que CD32A/B sirve como un importante co-receptor para la actividad de m3F9 sobre los macrófagos.

Los experimentos anteriores revelaron que las variantes humanizadas del anticuerpo anti-SIRPA 3F9 injertadas sobre una columna vertebral de IgG4 humana perdieron la actividad funcional. Se produjeron variantes de anticuerpo anti-SIRPA 3F9 de afinidad madurada sobre una columna vertebral de IgG1 humana y se evaluaron por su capacidad para regular hacia abajo a SIRPA y CD32A/B en comparación con el anticuerpo anti-SIRPA m3F9 parental y el anticuerpo anti-SIRPA 3F9 hulgG1 quimérico. La expresión de SIRPA y CD32A/B se detectó con anti-SIRPA DyLight650 (clon SA56) y anti-CD32A/B FITC (clon FUN2). Los anticuerpos 3F9-14, 3F9-18, 3F9-20, y 3F9-22 de afinidad madurada regularon hacia abajo a SIRPA hasta niveles similares a aquéllos observados con el anticuerpo anti-SIRPA m3F9 parental (los datos no se muestran). Sin embargo, los mismos anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada solamente mejoraron de modo mínimo la regulación hacia abajo de CD32A/B en comparación con aquello que se observó con el anticuerpo anti-SIRPA 3F9 hulgG1 quimérico. Estos resultados indicaron que el mejoramiento de la afinidad del anticuerpo al antígeno compensa para la dependencia de Fc sobre la regulación hacia abajo del receptor blanco (es decir SIRPA) pero no para las interacciones con FcγRs mediadas por Fc.

Para determinar si la ingeniería de Fc mejora además la regulación hacia abajo de SIRPA por medio de anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada, se introdujeron mutaciones del punto SELF dentro del dominio de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 hulgG1. Se trataron macrófagos humanos primarios a partir de 4 donantes sanos durante la noche con concentraciones en aumento de anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 humanizado portando Fc de IgG1 humana o Fc S267E/L328F de IgG1 humana (SELF) de tipo salvaje. La expresión de SIRPA se detectó con anti-SIRPA DyLight650 (clon SA56). Los donantes de sangre se genotipificaron para el polimorfismo de CD32A-R/H131 por medio de qPCR. Las **FIGS. 8A y 8B** ilustran resultados típicos de estos experimentos que comparan la actividad de ambas variantes de Fc. Entre los individuos homocigotos para el alelo CD32A-H131 (los donantes 516 y 517 se verificaron mediante qPCR), ambas variantes de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 regularon hacia abajo a SIRPA hasta niveles similares a aquéllos observados en los macrófagos humanos (**FIG. 8B**). Este resultado indicó que la mejorada unión a FcγR2B falla para mejorar la regulación hacia abajo de SIRPA mediada por anticuerpos.

Entre los individuos heterocigotos para ambos alelos CD32A-H131 y -R131, la variante de Fc de anti-SIRPA 3F9-22 hlgG1 mostró una mayor regulación hacia abajo de SIRPA máxima que aquélla observada con la variante de Fc de SELF (**FIG. 8A**). Más que mejorarla regulación hacia abajo de SIRPA, Fc de SELF puede limitar esta función. Para tener en cuenta, las mutaciones de SELF mejoran la afinidad de Fc hacia CD32B así como también el alelo CD32A-R131. Dado que esos macrófagos humanos expresan mayores niveles de CD32A que CD32B, los macrófagos a partir de individuos que expresan CD32A-R131 pueden aislar al anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 lejos de ya sea SIRPA o CD32B para limitar la actividad de regulación hacia abajo máxima.

La Tabla 15 a continuación proporciona un resumen de los resultados de la regulación hacia abajo de SIRPA y CD32 mediada por anticuerpo sobre la línea de macrófagos humanos U937. En estos estudios, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación se compararon con un anticuerpo anti-SIRPA KWAR23 descrito anteriormente (divulgado en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No: WO2015/138600). Como se muestra en la **Tabla 15**, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación regularon hacia abajo o redujeron la expresión de superficie celular de SIRPA en células U937, con un porcentaje máximo de regulación hacia abajo de entre 68% y 76%. En comparación, el anticuerpo anti-SIRPA KWAR23 solamente pudo regular hacia abajo la expresión de superficie celular de SIRPA en 9%.

La Tabla 15 también muestra que los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación fueron efectivos en la regulación hacia abajo o reducción de la expresión de superficie celular de CD32 en células U937. Como se muestra en la tabla, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación regularon hacia abajo o redujeron la expresión de la superficie celular de CD32 en estas células con un porcentaje máximo de regulación hacia abajo de entre 49% y 73%

TABLA 15

Anticuerpo	SIRPA		CD32	
	IC50 (nM)	Máx % DR	IC50 (nM)	Máx % DR
3F9 huIgG1	0,804	68%	0,9807	49%
3F9 mIgG1	0,105	75%	0,005609	73%
3F9-14	1,17	69%	2,028	50%
3F9-18	2,19	71%	4,861	52%
3F9-20	0,152	75%	0,2706	58%
3F9-22	0,187	76%	0,4305	60%

KWAR23	15,52	9%	0,07118	63%
--------	-------	----	---------	-----

Ejemplo 9: Los anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada degradan a SIRPA en los macrófagos

La medición de la regulación hacia abajo del receptor mediada por anticuerpo por medio de FACS confirma que la focalización del acoplamiento por parte del anticuerpo anti-SIRPA disminuye la expresión de la superficie celular. Para determinar si sí o si no los receptores internalizados se degradan y no se reciclan subsiguientemente a la superficie celular, se ensayaron macrófagos humanos para los niveles de proteína SIRPA totales a través de western blotting como sigue. Se trataron macrófagos humanos primarios derivados de monocitos durante la noche con 5 µg/ml ya sea de control de isotipo o variante de Fc de anti-SIRPA 3F9-22 A330S/P331S (ASPS). Las células se cosecharon, se lavaron con PBS frío, y se lisaron con tampón RIPA suplementado con inhibidores de proteasa/fosfatasa HALT sobre hielo durante 15 minutos. Las células lisadas se centrifugaron para sedimentar la fracción de membrana y se recogió el lisado celular total comprendiendo la fracción de sobrenadante. Según se muestra en la **FIG. 9A**, se cargaron cantidades crecientes de fracción de lisado celular a partir del anticuerpo de control de isotipo o de macrófagos tratados con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 sobre SDS-PAGE y se sometieron a inmunoblot para la proteína de SIRPA con un anticuerpo de antígeno específico. En la **FIG. 9A**, se cargaron 5 µg, 10 µg, y 20 µg de lisado de células enteras sobre SDS-PAGE y se sometieron a inmunoblot con dominio citoplasmático anti-SIRPA (α-SIRPAct). Se detecta una banda que migra con el pronosticado peso molecular de SIRPA en los macrófagos tratados con control de isotipo pero no se observa en los macrófagos tratados con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22. En un experimento similar, se cargaron lisados celulares a partir de macrófagos tratados con control de isotipo o anticuerpo 3F9-22 ASPS sobre SDS-PAGE y se sometieron a inmunoblot para

SIRPA y SHP-2, una tirosina fosfatasa que puede asociarse con SIRPA y otros receptores ITIM. En la **FIG. 9B**, 20 µg de lisado de células enteras se cargaron sobre SDS-PAGE y se sondearon con un-SIRPAct y anti-SHP2. Las manchas demuestran que el nivel de proteína SIRPA disminuye con el tratamiento con mAb 3F9-22. Según se muestra en la **FIG. 9B**, la estimulación del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 conduce a la degradación de SIRPA pero no de SHP2.

Ejemplo 10: Los anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada estimulan la fagocitosis de las células tumorales en los macrófagos

Los experimentos previos verificaron que los anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada mantuvieron la capacidad para regular hacia abajo a SIRPA y CD32A/B, conduciendo a la degradación de SIRPA en los macrófagos humanos. Los anticuerpos de afinidad madurada de la presente invención se ensayaron por la capacidad para inducir la fagocitosis de las células tumorales. Se trataron macrófagos humanos primarios durante la noche con control de isotipo o IgG1 humana 3F9-22 o SELF 3F9-22 para evaluar el efecto dependiente de Fc en la función de los anticuerpos. Células Raji marcadas con pHrodo se mezclaron con los macrófagos y se incubó durante 2 horas a 37°C. Se midió la actividad fagocítica mediante el conteo del porcentaje de macrófagos doble positivo CD14/pHrodo. Los resultados se presentan como el aumento en veces en el porcentaje de la población de macrófagos doble positivo pHrodo/CD14. Adicionalmente, se muestran los niveles de expresión de CD14 luego de la fagocitosis. Según se muestra en la **FIG. 10A**, ambas variantes de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 mejoraron la fagocitosis de las células Raji en relación con los macrófagos tratados con control de isotipo. Aunque el anticuerpo 3F9-22 SELF pareció inducir una mayor fagocitosis en comparación con el anticuerpo 3F9-22 hulgG1, esta diferencia no alcanzó significancia estadística.

Adicionalmente, ambas variantes de Fc de anti-SIRPA 3F9-22 regularon hacia abajo la expresión de CD14 hasta niveles similares, lo cual indicó una similar inducción de la actividad fagocítica y del estado de activación de macrófagos.

Un sello distintivo de la antagonización del eje de señalización de SIRPA-CD47 es el mejoramiento de la fagocitosis dependiente de anticuerpo de las células tumorales opsonizadas. En la **FIG. 10B**, la fagocitosis de las células Raji con o sin la adición de anti-CD20 hulG1 de opsonización se evaluó sobre macrófagos ratados con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22. En los macrófagos tratados con control de isotipo, la opsonización de células Raji con anti-CD20 hulG1 mejora la fagocitosis de las células tumorales ~50% en comparación con las células Raji no opsonizadas. Los resultados se presentan como el porcentaje de población de macrófagos doble positivo pHrodo/CD14. Como se ha mostrado previamente, los macrófagos estimulados ya sea con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 SELF o 3F9-22 ASPS mejoraron la fagocitosis de células Raji no opsonizadas en ~30-40% en relación con los macrófagos tratados con control de isotipo. De modo similar, los macrófagos tratados con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 mejoraron la fagocitosis ~30% en relación con los macrófagos tratados con control mezclados con células Raji opsonizadas anti-CD20. La adición de células Raji opsonizadas anti-CD20 a los macrófagos tratados con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 mostró un efecto aditivo sobre la fagocitosis con un aumento ~2 veces en relación con aquéllo observado con los macrófagos tratados con control mezclados con células Raji no opsonizadas. A pesar de que ambas variantes de Fc del anticuerpo 3F9-22 indujeron la fagocitosis de las células tumorales, la variante de Fc SELF presentó una estadísticamente significativa mayor actividad fagocítica que la variante de Fc ASPS. Estos resultados confirmaron que los anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada de la presente divulgación

mejoraron la fagocitosis de las células tumorales en los macrófagos a través de la antagonización de la vía SIRPA-CD47.

La Tabla 16 a continuación proporciona una síntesis de los valores de IC50 determinados para la regulación hacia abajo mediada por anticuerpos de SIRPA y CD32 en macrófagos primarios humanos. Adicionalmente, la Tabla 16 muestra el aumento en veces en la fagocitosis asociada con diversos anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación fagocitosis de las células tumorales. En estos estudios, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente invención se compararon con un anticuerpo anti-SIRPA HEFLB descrito previamente (divulgado en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No: WO2017/178653). Como se muestra en la Tabla 16, los anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada de la presente divulgación tienen valores de IC50 menores en comparación con aquéllos observados con el anticuerpo anti-SIRPA 3F9 huIgG1. Adicionalmente, los anticuerpos anti-SIRPA 3F9-14, 3F9-18, 3F9-20, y 3F9-22 mostraron valores de IC50 menores que el anticuerpo anti-SIRPA HEFLB. De modo similar, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación mostraron una mejor actividad de fagocitosis en comparación con el anticuerpo anti-SIRPA HEFLB.

TABLA 16

	SIRPA		CD32		Fagocitosis*
	IC50 (nM)	Max % DR	IC50 (nM)	Max % DR	
Anticuerpo					
3F9 huIgG1	0,1722	90%	0,679	67%	1,77
3F9 mIgG1	0,00905	89	0,0623	82%	1,51
3F9-14	0,0372	89%	0,135	62%	1,56
3F9-18	0,0174	90%	0,0915	65%	1,52
3F9-20	0,0283	90%	0,114	66%	1,62

3F9-22	0,0542	91%	0,133	66%	1,68
OSE					
HEFLB	0,0959	13%	n.d,	n.d,	1,05

n.d. = no determinado, * incremento en veces por encima de la actividad de línea de base

Ejemplo 11: Los anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada estimulan la fagocitosis de las células tumorales en los macrófagos M1 y M2

Los macrófagos experimentan una profunda transformación fenotípica en respuesta a señales microambientales adquiriendo distintos fenotipos pro-inflamatorio (M1) o anti-inflamatorio (M2). Los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación se evaluaron por su capacidad para inducir la fagocitosis de las células tumorales en macrófagos homeostáticos (tipo M2) e inflamatorios (tipo M1). Se aislaron monocitos a partir de sangre de voluntarios saludables utilizando centrifugación con gradiente de densidad sobre Ficoll. Se generaron macrófagos tipo M1 y tipo M2 mediante el cultivo de monocitos en presencia de GM-CSF (800 U/ml; Peprotech) o M-CSF (25 ng/ml; Peprotech) durante 6 días. Los macrófagos polarizados se trataron durante la noche con anticuerpo de control de isotipo o variantes de Fc de anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22. Células Raji marcadas con fluorescencia con o sin opsonización anti-CD20 hulgG1 se mezclaron con los macrófagos durante 2 horas a 37°C. Alternativamente, las células Raji se opsonizaron ya sea con anti-CD47 IgG4 (clon hu5F9) solo o con anti-CD47 y anti-CD20 hulgG1 y se adicionaron a los macrófagos no tratados. Se midió la actividad fagocítica mediante el conteo del porcentaje de macrófagos doble positivo CD14/pHrodo.

Según se muestra en la **FIG. 11A**, ambas variantes de Fc de macrófagos tipo M2 tratados con anticuerpo 3F9-22 mejoraron la fagocitosis de las células

tumorales en relación con los macrófagos tratados con control. En consonancia con las observaciones previas, la variante de Fc SELF del anticuerpo mostró un estadísticamente significativo mayor incremento en la fagocitosis de células Raji no opsonizadas y opsonizadas en comparación con el anticuerpo 3F9-22 hulgG1. Más aún, los macrófagos tipo M2 tratados con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 SELF mejoraron la fagocitosis de células Raji no opsonizadas y opsonizadas hasta un extremo similar al de las células Raji tratadas con anti-CD47 IgG4.

Los macrófagos tipo M1 diferenciados de los monocitos cultivados en presencia de GM-CSF tienen diferentes propiedades que los macrófagos tipo M2 derivados de MCSF. Por ejemplo, los macrófagos tipo M1 derivados de GM-CSF disminuyen la expresión de CD14, CD32A/B, y SIRPA. Adicionalmente, los macrófagos tipo M1 parecen fagocitar a las células Raji no opsonizadas a una velocidad más alta que los macrófagos tipo M2 (**FIG. 11B**) derivados a partir del mismo donante saludable. Luego de la estimulación ya sea con variantes de Fc de anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22, los macrófagos tipo M1 incrementaron la fagocitosis de células Raji no opsonizadas ~50% en relación con los macrófagos tratados con control. La opsonización de células Raji con anti-CD20 hulgG1 falla en mostrar un efecto aditivo sobre la fagocitosis por parte de los macrófagos tipo M1 tratados con anticuerpo 3F9-22, lo cual contrasta con las observaciones elaboradas con los macrófagos tipo M2. De modo similar, las células Raji opsonizadas con anti-CD47 IgG4 con o sin anti-CD20 hulgG1 también fallaron en aumentar la fagocitosis por encima de los niveles de línea de base cuando se adicionaron a los macrófagos tipo M1 (**FIG. 11B**). Puesto que los macrófagos derivados de GM-CSF regularon hacia abajo la expresión de FcγR, estas células pueden poseer un menor potencial para mediar la fagocitosis dependiente de anticuerpos. Estos resultados también sugirieron que el anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 funciona mediante la antagonización de SIRPA para inducir la fagocitosis

tanato en los macrófagos M1 como M2, mientras que los anticuerpos anti-CD47 funcionan principalmente como agentes de opsonización que requieren el acoplamiento de FcγRs sobre los macrófagos tipo M2 para inducir la fagocitosis.

Ejemplo 12: Las terapias de combinación mejoran la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada

Un pequeño subconjunto de células cancerígenas, denominadas células que inician tumores (TICs) o células madre cancerígenas (CSCs), forman un reservorio de células cancerígenas autosuficientes que tienen la capacidad para auto-renovarse y mantener la masa tumoral. La evidencia sugiere que las células de los tumores sólidos de humanos y CSCs regulan hacia arriba la expresión de CD47 para evadir los mecanismos de vigilancia inmunológica permitiendo la metástasis y proliferación de las células tumorales. Los modelos de cultivo de tumosfera, en los cuales crecen las células cancerígenas como racimos de células esferoides tri-dimensionales, se utilizan ampliamente para analizar la capacidad de auto-renovación de las CSCs y para estimular mejor las condiciones de crecimiento celular *in vivo*. La formación de tumosfera se basa en el cultivo de células cancerígenas sobre placas de fijación ultrabajas en medios libres de suero suplementados con factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento de fibroblastos de base. Las tumosferas de co-cultivo con macrófagos humanos primarios permite la evaluación de los anticuerpos anti-SIRPA sobre la viabilidad de las células tumorales ya sea como un agente único o en combinación con otras terapias antitumorales.

La línea celular MDA-MB-231 es una línea celular de cáncer de mama triple negativo humana bien caracterizada que previamente demostró formar tumosferas. Con el objeto de medir la viabilidad de las células tumorales en ensayos de co-cultivo, las células MDA-MB-231 se transdujeron con un lentivirus

para la expresión constitutiva de luciferasa y GFP (MB231-Luc). Para la formación de tumosfera, se sembraron 10.000 células MB231-Luc por pocillo sobre placas de 96 pocillos en Medios de Tumosfera Libre de Suero StemXVivo (R&D Systems) suplementado con heparina e hidrocortisona. Los medios de tumosfera también se suplementaron con MCSF para sostener la viabilidad de los macrófagos. Se cultivaron MB231-Luc durante 2-3 días ya sea solas o en presencia de 50.000 macrófagos/pocillo. Se cuantificó la viabilidad de las células tumorales a través de la medición de la actividad de luciferasa con Reactivo OneGlo (Promega) adicionado a cada pocillo e incubando la mezcla durante 3 min a temperatura ambiente sobre un agitador de placas. La señal de luminiscencia se detectó con un Lector de Microplaca BioTek Sinergi™ utilizando software GEN5™ 2.04.

Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 que expresan constitutivamente la luciferasa se cultivaron ya sea solas o en presencia de macrófagos humanos en medios suplementados con tumosfera libre de suero con MCSF. Las células se trataron durante 2 días a 37°C con anti-EGFR (2ug/mL), anti-PDL1 (2ug/mL), o paclitaxel (0,5 uM) con o sin anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22. Como comparación, las células tumorales solas o en presencia de los macrófagos se trataron con anti-CD47 IgG4. Se cuantificó la viabilidad de las células tumorales mediante la medición de la actividad de luciferasa con reactivo de sustrato OneGlo. Según se muestra en la **FIG. 12A**, las células MB231-Luc proliferaron en el cultivo con o sin macrófagos en base a los valores de luminiscencia. El anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 solamente inhibió la viabilidad de las células tumorales cuando las células MB231-Luc formaron tumosferas en presencia de los macrófagos. Este resultado demostró que los macrófagos mantienen el potencial tumoricida bajo condiciones de cultivo optimizadas para la

viabilidad del tumor. Bajo condiciones similares, anti-CD47 IgG4 no inhibió significativamente la viabilidad de MB231-Luc.

Después de verificar la eficacia de agente único del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 en este ensayo de viabilidad de tumosfera, se llevaron a cabo estudios adicionales para mostrar el efecto del tratamiento combinatorio. Dado que la viabilidad de las células tumorales reside en EGF presente en los medios, la adición de anticuerpo de bloqueo anti-EGFR mostró una profunda inhibición del crecimiento tumoral cuando las células MB231-Luc se cultivan solas. La actividad antitumoral del anticuerpo anti-EGFR no es mejorada en presencia de macrófagos sin tratar. Sin embargo, los macrófagos tratados con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 potenciaron la actividad antitumoral del anticuerpo anti-EGFR hasta un extremo estadísticamente significativo. Bajo condiciones de cultivo similares, el anticuerpo anti-PDL1 reveló un inesperado fenotipo mediante la inducción de la apoptosis de las células tumorales fuertes, independientemente de la presencia de los macrófagos. También se redujo la viabilidad de las células MB231-Luc cuando se expusieron a 500 nM de paclitaxel, un agente quimioterapéutico que estabiliza los microtúbulos comúnmente utilizado para tratar múltiples cánceres. La combinación de paclitaxel con macrófagos tratados con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 también muestra una reducción estadísticamente significativa en la viabilidad de las células tumorales. Estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación mejoraron la actividad de las terapias anti-tumorales que funcionan por medio de diversos mecanismos de acción más allá de la opsonización de las células tumorales.

Se cultivaron células de cáncer de mama MDA-MB-231 que expresan de modo constitutivo la luciferasa ya sea solas o en presencia de macrófagos humanos en medios de tumosfera libre de suero suplementados con MCSF o MCSF + IL-4 + IL-10. Donde fue indicado, las células se trataron o bien con

anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 o con anti-CD47 IgG4 durante 3 días a 37°C. Se cuantificó la viabilidad de las células tumorales a través de la medición de los valores de luminiscencia siguiendo a la adición con reactivo OneGlo conteniendo sustrato de luciferasa. En ocasiones, los macrófagos derivados de monocitos a partir de voluntarios saludables co-cultivados con células MB231-Luc inhibieron la viabilidad de las células tumorales sin tratamiento (**FIG.12B**). Para asegurar que los macrófagos co-cultivados con las células MB231-Luc adopten un fenotipo inmunosupresor más similar a un tumor, los medios de la tumosfera se suplementaron con IL-4 e IL-10. Según se muestra en la **FIG. 12B**, las células MB231-Luc cultivadas solas proliferaron igualmente bien en medios suplementados con MCSF o MCSF más IL-4 e IL-10. Sin embargo, en medios solamente suplementados con MCSF, los macrófagos a partir del donante 570 redujeron la viabilidad de las células tumorales hasta un extremo estadísticamente significativo. Esta inhibición se revierte mediante la adición de IL-4 e IL-10 demostrando que las diferentes estrategias de cultivo polarizan los macrófagos para modular el crecimiento de las células tumorales. De manera importante, el tratamiento de los macrófagos con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 disminuyó significativamente la viabilidad de las células tumorales bajo condiciones de crecimiento.

Ejemplo 13: Los anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada mejoran la proliferación de las células T

Las células T forman una sinapsis inmunológica con las células que presentan antígenos (APC) para iniciar la activación y proliferación de las células T. La expresión de CD47 sobre las células T puede contrarrestar la activación por medio de la transmisión de una señal inhibidora a las APCs a través de SIRPA. Sin embargo, las células T también expresan SIRPG, otro miembro de la familia

SIRP capaz de unir CD47 expresados en APCs. La interacción de SIRPG (células T)- CD47 (APC) ha demostrado estabilizar la sinapsis inmunológica y promover la activación y proliferación de las células T. Aunque los anticuerpos anti-CD47 bloquean la señal inhibidora suministrada a través de SIRPA, los anticuerpos anti-CD47 también bloquean el efecto estimulador a partir de la unión a SIRPG, y de este modo, pueden resultar perjudiciales en el montaje de una efectiva respuesta anti-tumoral de las células T. Los anticuerpos antagonísticos anti-SIRPA, por lo tanto, evitan este potencial inconveniente mediante la inhibición de la señalización de SIRPA sin interrumpir a las interacciones críticas en la sinapsis inmunológica. Para evaluar esta hipótesis, se evaluaron los anticuerpos anti-SIRPA en ensayos MLR de una vía y de dos vías.

El principio de un ensayo MLR es que las APC derivadas a partir de un donante, usualmente DCs, presentan péptidos sobre moléculas MHC a las células T aisladas a partir de un donante separado. Una pequeña fracción de células T expresará TCRs capaces de reconocer el complejo MHC:péptido y proliferará bajo la coestimulation. En este MLR de una vía, las células a partir de un donante participan en la presentación de antígenos y las células a partir de otro donante responden por medio de la proliferación. En un MLR de dos vías, ambos donantes aportan APCs y células T a la reacción; de este modo, dos poblaciones de células T separadas responden por medio de la proliferación.

El efecto de los anticuerpos anti-SIRPA sobre la proliferación de células T se evaluó inicialmente en ensayos MLR de dos vías. Se aislaron PBMCs a partir de donantes sanos y se co-cultivaron durante 3 días en presencia de concentraciones en aumento de variantes de Fc 3F9-22 o control de isotipo. La proliferación de las células T se estimó mediante la cuantificación de la presencia de células metabólicamente activas como un indicador de la cantidad de células. Se cuantificó la actividad metabólica con reactivo CellTiter Glo (Promega), el cual

genera una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. Según se muestra en la **FIG. 13A**, PBMCs tratados con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 mostraron ~1,5 veces de incremento en la luminiscencia en relación con los PBMCs tratados con isotipo, lo cual sugirió un aumento en la proliferación de células T. En contraste con los ensayos de fagocitosis descritos previamente, la variante de Fc del anticuerpo 3F9-22 hulgG1 tendió a estimular la proliferación de células T de modo más efectivo que la variante de Fc SELF.

Para determinar si la luminiscencia incrementada observada con el anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 es específica para los anticuerpos anti-SIRPA, se repitió el ensayo MLR con anticuerpo anti-CD47. Se aislaron PBMCs a partir de dos donantes sanos y se mezclaron 100.000 células a partir de cada donante conjuntamente con concentraciones en aumento del anticuerpo o anticuerpo de control de isotipo evaluado. Se midió la proliferación celular con reactivo CellTiter Glo después de 3 días de co-cultivo. Según se muestra en la **FIG. 13B**, las variantes de Fc de los anticuerpos anti-SIRPA 3F9-14 y 3F9-22 hulgG1 y ASPs aumentaron la señal de luminiscencia ~70% en relación con aquéllo observado con PBMCs tratados con anticuerpo de control de isotipo. Los anticuerpos anti-SIRPA sobre SELF Fc (3F9-14 SELF y 3F9-22 SELF) fallaron en aumentar la señal de luminiscencia en relación con el control bajo las mismas condiciones estableciendo otro efecto dependiente de Fc sobre la función del anticuerpo. En contraste con el anticuerpo 3F9-22 hulgG1, el tratamiento con anti-CD47 mostró un incremento marginal ~10% en la luminiscencia. Tomados en conjunto, los resultados a partir de los experimentos MLR de dos vías sugirieron que la antagonización de SIRPA con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 hulgG1 promueve la proliferación de células T.

Dado que la cuantificación de la actividad metabólica en MLR de dos vías es una medición indirecta de la proliferación de células T, se llevaron a cabo

ensayos MLR de una vía más tradicionales para confirmar el efecto estimulador observado con el anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 hulgG1. Se derivaron células dendríticas humanas primarias (DCs) a partir de monocitos de donantes sanos y se co-cultivaron con células T alogénicas marcadas con tinte CFSE en una relación 1:5. Las células dendríticas se trataron o bien con variantes de Fc de anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 o anti-CD47 (hu5F9) o anticuerpo de control de isotipo y se incubó a 37°C durante 5 días. Se midió la proliferación de células T a través de la tinción de las células T con anti-CD3 APC y el ingreso de una baja población de CFSE. La **FIG. 14A** muestra que las DCs a partir de diferentes donantes tratados con anticuerpo 3F9-22 hulgG1 o ASPS aumentó la proliferación de células T en ~50% en relación ya sea con las DCs tratadas con isotipo o con las DCs tratadas con anti-CD47. Este aumento en la proliferación de células T es proporcional al aumento en la luminiscencia observado con PBMCs tratados con anticuerpo 3F9-22 hulgG1 in en el MLR de dos vías. La **FIG. 14B** muestra un diagrama representativo de FACS para los datos que se presentan en la **FIG. 14A**. Los resultados a partir de MLR de una vía y de dos vías de este modo sugirieron que la antagonización de SIRPA con el anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 hulgG1 sin el bloqueo de la interacción SIRPG-CD47 puede promover la proliferación de células T.

Ejemplo 14: Los anticuerpos anti-SIRPA de afinidad madurada mejoran la liberación de citoquina pro-inflamatoria

Para diferenciar más aún la actividad de las variantes de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22, se estimularon macrófagos humanos primarios a partir de dos voluntarios saludables durante la noche con pérdidas de dosis de LPS en combinación con anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 o anticuerpo de control de isotipo. En la **FIG. 15A**, se estimularon macrófagos humanos primarios a partir de 2

donantes sanos durante la noche a 37°C con 0,5 ng/mL de LPS en combinación ya sea con variante de Fc de anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 o con anticuerpo de control de isotipo. Se recogieron las fracciones sobrenadantes y se analizaron para los niveles de TNF α por medio de ELISA. En la **FIG. 15B**, se estimularon macrófagos humanos primarios durante la noche a 37°C con 0,5 ng/mL de LPS en combinación ya sea con concentraciones en aumento de la variante de Fc de anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 o con anticuerpo de control de isotipo. Se recogió la fracción de sobrenadante y se analizó por medio de ELISA para la liberación de TNF α . Según se muestra en la **FIG. 15A** y en la **FIG. 15B**, los macrófagos co-estimulados con anticuerpo 3F9-22 ASPS exhibieron un significativo incremento en la secreción de TNF α en relación ya sea con las células coestimuladas con anticuerpo de control de isotipo o anticuerpo 3F9-22 SELF. La variante de Fc del anticuerpo 3F9-22 SELF mostró mínima actividad co-estimuladora. La titulación de los anticuerpos anti-SIRPA mostró un patrón similar donde las variantes de anticuerpo 3F9-22 hulG1 y ASPS claramente aumentaron la liberación de TNF α en una manera dependiente de la dosis por los macrófagos cebados con LPS, mientras que el anticuerpo 3F9-22 SELF muestra una disminuida respuesta de TNF α con alta variabilidad. Estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-SIRPA de bloqueo a non-CD47 antagonizan a SIRPA en una manera dependiente de Fc para liberar la inhibición a partir de la señalización,

Ejemplo 15: Mapeo de epítomos de los sitios de unión al anticuerpo anti-SIRPA

Se llevó a cabo el mapeo de epítomos de los anticuerpos anti-SIRPA utilizando una biblioteca de escaneo de alanina creada mediante mutagénesis de alto rendimiento de la secuencia de ADNc de SIRPA de humano. Una construcción de expresión de SIRPA que codifica una marca de epítomo V5 C-

terminal se sometió a mutagénesis de escaneo de alanina de alto rendimiento (destacada en Davidson y Doranz, 2014 Inmunología 143, 13-20) para generar una biblioteca de mutación completa. Cada uno de los residuos que representan el dominio extracelular de SIRPA (aminoácidos 31-374 de SEQ ID NO:1) se mutaron, mayormente a alanina, mientras que los codones de alanina se mutaron a serina.

Los clones de biblioteca mutante de SIRPA, dispuestos en una microplaca de 384 pocillos, se transfectaron individualmente dentro de células HEK-293T y se dejó que se exprese durante 22 horas. Los anticuerpos se digirieron para generar Fabs, luego de lo cual se incubaron las células con Fabs diluido en 10% suero de cabra normal (NGS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Previo al cribado de biblioteca, se determinaron las concentraciones primarias de Fab utilizando una curva de titulación de inmunofluorescencia independiente contra las células que expresan SIRPA de tipo salvaje para asegurar que las señales se encontraban dentro del rango de detección lineal. Se detectaron Fabs utilizando 7,5 µg/ml conjugado de AlexaFluor488-anticuerpo secundario (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA) en 10% NGS. Las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en Cellstripper (Cellgro, Manassas, VA) con 0,1% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). En algunos casos, se utilizaron condiciones más elevadas de rigurosidad, incluyendo un pH mayor, una temperatura más elevada, y un mayor tiempo de disociación. Se detectó la fluorescencia celular media utilizando el citómetro de flujo de alto rendimiento Intellicit (HTFC, Intellicit, Albuquerque, NM). Se calcularon las reactividades de Fab contra cada clon mutante en relación con la reactividad de la proteína SIRPA de tipo salvaje mediante la sustracción de la señal a partir de controles transfectados de modo simulado, y la normalización a la señal a partir de controles transfectados de SIRPA de tipo salvaje.

Los residuos mutados dentro de los clones de biblioteca se identificaban como “críticos” hacia el epítopo de unión a Fab si ellos no soportaban la reactividad del Fab evaluado pero sí soportaban la reactividad del anticuerpo de referencia disponible en el comercio, MAB4546 (R&D Systems), o Fabs de anti-SIRPA adicionales. Esta estrategia de pantalla contraria facilitó la exclusión de mutantes de SIRPA que se encontraban mal plegados localmente o que tenían un defecto de expresión.

El anticuerpo anti-SIRPA 9C2 está descrito en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2017/65366.

mAb 9C2: Secuencia de dominio variable de cadena pesada

EFQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGISLTGINMNWVKQSRGKSLEWIGNINPHIGSSTIN
QNFKDKATLTVDKSSSAAIMQFNSLTSEDSAVIICAREGIDGVFDIWGQGTTTLTVSS
(SEQ ID NO:45)

mAb 9C2: Secuencia de dominio variable de cadena ligera

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSIMHWIQQKPGSSPKPWIIIVTSNLSGVPTRF
SGSGSGTSISLTISRVEAEDAATIIICQQWSSNPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:46)

La **Tabla 17** a continuación representa los rangos y reactividades de unión medios para todos los residuos identificados como críticos en los cribados. Los residuos críticos primarios se definieron como los residuos donde las mutaciones fueron negativas para la unión al anticuerpo evaluado (<30% de unión a WT) pero positivas para el anticuerpo de control (>80% WT). La **FIG. 16** representa modelos de estructura cristalina de SIRPA (PDB ID 2WNG; Hatherley et al., 2009, J Biol Quím, 284:26613-9) destacando los residuos críticos para la unión de anticuerpos anti-SIRPA 3F9 y 9C2 como esferas sombreadas.

Según se indica en la **Tabla 18**, los residuos de SIRPA críticos involucrados en la unión por medio de anticuerpo anti-SIRPA 3F9 incluyen a los residuos de los aminoácidos R282, Q284, y G337 de la secuencia de SIRPA v1 de humano que se muestra anteriormente. Los residuos de SIRPA críticos involucrados en la unión por medio de anticuerpo 9C2 (según se divulga en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2017/65366) incluyen a los residuos de los aminoácidos Q281, R282, Q284, L285, W287, R295, E297, V302, y W315 de la secuencia de SIRPA v1 de humano que se divulgó anteriormente. Estos residuos yacen dentro del dominio Ig de SIRPA proximal a la membrana, referido en la literatura científica de SIRPA como el dominio D3, el cual corresponde a los aminoácidos 254-348 de la secuencia de SIRPA v1 de humano. Múltiples informes publicados demuestran que el dominio D3 de SIRPA de humano se une a moléculas de reconocimiento de patrones en la familia colectina, a saber las proteínas surfactantes D y A (Sp-D y Sp-A, respectivamente).

TABLA 17: Residuos críticos para la Unión de 3F9 y 9C2

Reactividad de Unión (%P)		
Mutación	3F9 Fab	9C2 Fab
Q281A	151,1 (14)	14,1 (11)
R282A	3,8 (2)	4,7 (2)
Q284A	3,3 (1)	6,5 (5)
L285A	107,0 (12)	17,9 (1)
W287A	124,8 (12)	2,4 (2)
R295A	120,9 (10)	1,8 (2)
E297A	116,9 (14)	5,3 (0)

V302A	92,3 (29)	4,9 (0)
W315A	117,3 (10)	19,0 (6)
G337A	17,9 (9)	36,3 (68)

TABLA 18: Residuos involucrados en la unión de anticuerpo anti-SIRPA

Anticuerpo	Residuos SIRPA críticos
3F9	R282, Q284, G337
9C2	Q281, R282, Q284, L285, W287, R295, E297, V302, W315

EJEMPLO 16: Los anticuerpos anti-SIRPα mejoran la actividad antitumoral de los inhibidores de punto de control en un modelo de tumor singénico

Los anticuerpos terapéuticos que focalizan la vía SIRPA-CD47 pueden depender de modelos de xenoinjertos de tumores para estudios de demostración conceptual en los cuales ratones NOG o NOD inmunodeficientes sostienen el crecimiento de células cancerígenas humanas implantadas. Dado que la variante alélica de SIRPA murino expresada por los ratones NOD se une a CD47 de humano, esta interacción permite el injerto de células humanas dentro de un huésped murino. Sin embargo, estos ratones también pueden exagerar el rol de la vía porque SIRPA de NOD se une a CD47 de humano con mayor afinidad que SIRPA de humano. Más aún, las mutaciones Prkdc^{SCID} e IL2Rγ^{Null} en cepas de ratones inmunodeficientes eliminan a las células T, a las células B, y a las células NK, tornando de este modo a las células mieloides y al sistema inmune innato como las únicas células efectoras disponibles para inhibir el crecimiento tumoral. Los modelos de xenoinjertos de tumores no permiten la interrogación de terapias que se focalizan en las células inmunes innatas para cebar o mejorar una respuesta inmune adaptada al tumor. De este modo, para evaluar a los

anticuerpos anti-SIRPA humanos de la presente divulgación en el contexto de huéspedes animales inmunocompetentes, se introdujeron los genes para SIRPA de humano y CD47 de humano dentro de una cepa de ratón C57BL6/J.

Brevemente, Cromosomas Artificiales Bacterianos (BACs) albergando ácido nucleico que codifica SIRPA de humano o que codifica CD47 de humano con secuencias flanqueantes para incluir elementos reguladores de genes humanos relevantes se identificaron utilizando el CloneDB y el navegador del genoma UCSC a partir de NCBI. Se identificó un clon de BAC (BACRP11-636L228) del que se predijo que contiene las secuencias codificantes para el gen de SIRPA de humano. Se identificó otro clon de BAC (BACRP11-671F8) del que se predijo que contiene las secuencias codificantes para el gen de CD47 de humano. Luego los ratones que albergaban los clones de BAC de interés se generaron inyectando el ADN de BAC purificado dentro de cigotos de ratón C57BL6/J utilizando técnicas de inyección pronuclear estándar. Los cigotos se regresaron a ratones hembra, y los cachorros murinos resultantes se genotipificaron por la presencia del transgén deseado. Luego los animales fundadores que contenían el transgén se criaron hasta animales no transgénicos, y la progenie se cribó para la expresión del transgén mediante PCR utilizando técnicas estándar y adicionalmente por medio de tinción FACS de las células de sangre periférica a partir de los animales. Los ratones transgénicos BAC albergando cada gen individual de interés se entrecruzaron con el objeto de producir ratones “humanizados” que expresan ambos SIRPA de humano y CD47 de humano.

Además de someter a ingeniería a ratones para expresar SIRPA de humano y CD47 de humano como se describió anteriormente, también se sometieron a ingeniería líneas de células tumorales singénicas para reemplazar CD47 de ratón con CD47 de humano. Brevemente, se utilizó tecnología CRISPR-

Cas9 para introducir complejos Cas9/ARN guía (ARNg) dentro de las células blanco MC38. La formación de indel mediada por Cas9/ARNg en la región blanco (exón 2 de CD47 de ratón) resultó en un cambio de marco y/o parada prematura, eliminando de este modo la expresión del gen CD47 de ratón endógeno. Después de transfectar ARNg y Cas9, se cribaron clones derivados de células únicas mediante secuenciación y se expandieron clones homocigotos que contenían la mutación deseada. Como se muestra en la **FIG. 17A** (panel superior), los análisis FACS de células MC38 parentales y de la línea celular knockout de CD47 de ratón (MC38-mCD47KO) teñidas con un anticuerpo CD47 anti-ratón confirman la pérdida de la expresión de CD47 de ratón en estas células sometidas a ingeniería. Subsiguientemente, células MC38-mCD47KO cells fueron transducidas con un lentivirus que contenía el inserto de gen de CD47 de humano. Se seleccionaron células MC38-mCD47KO-huCD47+ con puromicina y se expandieron. La **FIG. 17A** (panel inferior) muestra un histograma de FACS que verifica la expresión de CD47 de humano en la población celular seleccionada.

Los efectos antitumorales de los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación se evaluaron *in vivo* utilizando un modelo de carcinoma de colon de ratón con ratones huSIRPA/huCD47 BACtg injertados con células MC38-mCD47KO-huCD47+ en combinación con un inhibidor de punto de control de células T. A estos ratones se les inyectó por vía subcutánea 500.000 células MC38 en el flanco derecho. La terapia con anticuerpos comenzó cuando se distribuyó a los ratones aleatoriamente en grupos aproximadamente diez días después del trasplante celular o cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 80 mm³. Los ratones recibieron dos inyecciones intraperitoneales (IP) por semana durante 3 semanas de anticuerpo anti-SIRPA 3F9 mIgG1 o anticuerpo anti-SIRPA 3F9 mIgG2A a 10 mg/kg en combinación con una dosis subóptima de anticuerpo PDL1 anti-ratón (clon 10F.9G2, Bioxcell) a 5 mg/kg. Los

animales se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un volumen de ~2000 mm³.

La **FIG. 17B** muestra las curvas de crecimiento tumoral promedio de ratones trasgénicos huSIRPa/huCD47 BAC implantados por vía subcutánea con células MC38 sometidas a ingeniería para carecer de la expresión de CD47 de ratón y sobreexpresar CD47 de humano (MC38-mCD47KO/huCD47+). Se trató a los ratones o bien con anticuerpo de control de isotipo, anticuerpo PDL1 anti-ratón, anticuerpo anti-SIRPA 3F9 mIgG1 más anticuerpo PDL1 anti-ratón, o anticuerpo anti-SIRPA 3F9 mIgG2A más anticuerpo PDL1 anti-ratón, según se indicó. El tratamiento se inició cuando los tumores fueron un promedio de 80 mm³. Como se muestra en la **FIG. 17B**, el tratamiento con anticuerpo anti-PDL1 inhibió el crecimiento tumoral en 20% en relación con los animales tratados con anticuerpo de control de isotipo, los cuales no alcanzaron significancia estadística. Sin embargo, la terapia de combinación de anticuerpo anti-PDL1 o bien con anticuerpo anti-SIRPA 3F9 mIgG1 o con anticuerpo anti-SIRPA 3F9 mIgG2A además inhibió el crecimiento tumoral en estos animales en 40% y 47%, respectivamente. La **FIG. 17C** muestra diagramas de espaguetis del volumen del tumor de cada animal dentro de los grupos de tratamiento. Excepto por unos pocos pobres respondedores, los volúmenes de los tumores no superan 1000 mm³ en la mayoría de los animales en los grupos de tratamiento con terapia de combinación, mientras que los tumores en varios animales en el grupo de control de isotipo o en el grupo de monoterapia con anticuerpo anti-PDL1 alcanzaron el límite de 2000 mm³.

Estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-SIRPA 3F9 de la presente divulgación son efectivos en el mejoramiento de la actividad antitumoral de los inhibidores de punto de control en un modelo animal inmunocompetente que codifica la vía SIRPA-CD47 de humano. Estos resultados indicaron que los

anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación son útiles para el mejoramiento de la actividad antitumoral de los inhibidores de punto de control. En consecuencia, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación son efectivos en el tratamiento del cáncer cuando se utilizan en combinación con una terapia con inhibidor de punto de control.

EJEMPLO 17: Los anticuerpos anti-SIRPa regulan hacia abajo la expresión de SIRPA sobre las células mieloides infiltrantes de tumores en tumores singénicos de ratón

El EJEMPLO previo demostró la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación en ratones transgénicos BAC SIRPA/CD47 de humano. Para verificar esa actividad antitumoral correlacionada con la regulación hacia abajo de SIRPA mediada por anticuerpos sobre los macrófagos tumorales, se caracterizaron células mieloides tumorales luego de la administración del fármaco.

Ratones transgénicos BAC SIRPA/huCD47 de humano fueron implantados por vía subcutánea en el flanco derecho con 500.000 células MC38-mCD47KO/huCD47+. Los tumores en los ratones crecieron hasta un volumen promedio de ~400 mm³ antes de la administración de los anticuerpos. Los ratones recibieron dos inyecciones IP de anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 mIgG2A con tres días de diferencia a 3 mg/kg, 10 mg/kg, o 30 mg/kg. Los ratones de control recibieron 2 inyecciones IP de isotipo mIgG2A a 10 mg/kg. El tejido tumoral y los bazo se cosecharon a partir de los ratones 1 día, 4 días, y 8 días después de la administración de la segunda dosis del anticuerpo. Los bazo se procesaron dentro de una suspensión unicelular por medio de disociación mecánica a través de un colador de células de 70 µm. Luego las células se lavaron con PBS y los glóbulos rojos se lisaron con tampón de lisis ACK.

Subsiguientemente, las células se resuspendieron en tampón FACS que constaba de PBS/2%FBS y se prepararon para la tinción. De modo similar, los tejidos tumorales se procesaron dentro de suspensiones unicelulares con disociación mecánica y enzimática con el Disociador gentleMACS™ (Miltenyi Biotec). El homogeneizado de tejido se filtró a través de un colador de células de 70 µm y se resuspendió en tampón FACS que constaba de PBS/2%FBS para la tinción. Las células se tiñeron con el siguiente panel:

TABLA 19

Fluorocromo	Marcador	Clon
AmCyan (BV510)	Vivo/Muerto	
PECy7	mCD45	30-F11
Pacific Blue (BV421)	mCD11b	M1/70
PerCp/Cy5.5	mF4/80	BM8
APC/Cy7	mLy6G	1A8
AF488 (FITC)	mLy6C	HK1.4
APC	hSIRPa	SE5A5

La **FIG. 18A** muestra el cambio relativo en la expresión de SIRPA con el paso del tiempo en células mieloides infiltrantes de tumores (monocitos y macrófagos). Los macrófagos asociados con tumores se definieron como células CD45+ CD11b+ F4/80+ Ly6C- Ly6G-, mientras que los monocitos infiltrantes de tumores se definieron como células CD45+ CD11b+ F4/80- Ly6C+ Ly6G-. En comparación con los animales a los que se les administró anticuerpo de control de isotipo, los animales a los que se les administró anticuerpo anti-SIRPA mostraron una reducción de casi el 80% de la expresión de SIRPA en la superficie celular 1

día después de la administración del anticuerpo en ambos monocitos tumorales y macrófagos tumorales. La expresión de SIRPA regresó a los niveles de línea de base después de 4 días o de 8 días en ratones a los que se les administró 3 mg/kg o 10 mg/kg de anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 mIgG2A, respectivamente. El nivel de expresión de SIRPA se estabilizó hasta aproximadamente 50% por debajo de la línea de base en ratones a los que se les administró 30 mg/kg de anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 mIgG2A.

El compartimento esplénico también fue de perfil inmune para determinar si podría determinarse alguna correlación con el microambiente del tumor. Los monocitos esplénicos parecían más resistentes a la regulación hacia abajo del receptor mediada por anticuerpos en relación con aquéllo observado en los monocitos tumorales (**FIG. 18B**). Los monocitos esplénicos se definieron como las células CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁻ Ly6C⁺ Ly6G⁻. Los macrófagos de pulpa roja esplénicos se definieron como células CD45⁺ CD11b⁻ F4/80⁺ Ly6C⁺. Los monocitos esplénicos demostraron una regulación de SIRPA hacia abajo máxima de ~40% un día después de la administración del anticuerpo y rápidamente recuperaron la expresión del receptor en puntos temporales posteriores. Los macrófagos de pulpa roja esplénicos, por otro lado, siguieron un patrón similar de expresión del receptor de SIRPA según se observó con los macrófagos tumorales.

Tomados en conjunto, estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación son efectivos en la reducción (regulación hacia abajo) de los niveles de SIRPA sobre los macrófagos, en particular los macrófagos asociados a tumores, y que la reducción o regulación hacia abajo de los niveles de SIRPA sobre los macrófagos se correlaciona con la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación.

EJEMPLO 18: Los anticuerpos anti-SIRPA regulan hacia abajo la expresión de SIRPA en las células mieloides infiltrantes de tumores en ratones con sistema inmune humano (HIS)

Dado que el dominio Fc de los anticuerpos anti-SIRPA desempeña un rol en la regulación hacia abajo del receptor y en la función del anticuerpo, se emplearon ratones reconstituidos con un sistema inmune humano para comparar la actividad de diferentes variantes de Fc con los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación. Los modelos de ratón HIS necesitan el injerto de células madre hematopoyéticas humanas CD34+ (hHSCs) obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical dentro de ratones inmunodeficientes (es decir cepa NOG) luego de su preacondicionamiento con irradiación subletal. HSCs de modo estable desarrollan linajes celulares extensivos, especialmente poblaciones de linfocitos, en sangre periférica, médula ósea, timo, y bazo (así como también otros tejidos). Los ratones NOG sometidos a ingeniería para expresar GM-CSF de humano y IL-3 de humano (NOG-EXL; Taconic) proporcionan la ventaja adicional de soportar una mayor diferenciación de células mieloides en comparación con otras cepas de ratones. Los ratones HIS ofrecen la oportunidad de estudiar human las interacciones tumor-sistema inmune in vivo en ratones implantados con líneas de células cancerígenas humanas. Adicionalmente, los ratones HIS ayudan a evaluar los mecanismos de acción de candidatos a anticuerpos terapéuticos en una configuración in vivo.

Los ratones se inocularon con células de melanoma humano A375 por vía subcutánea en la región del flanco a una densidad celular de 3×10^6 células por ratón con 50% Matrigel (Cat.354234; Corning). Los tumores crecieron hasta un volumen promedio de 400 mm³ antes de que los ratones recibieran 2 inyecciones IP de control de isotipo 3F9-22 hulgG1 P331S (PS), 3F9-22 hulgG1 N325S/L328F (NSLF), o hulgG1 a 10 mg/kg con tres días de diferencia. Se cosecharon sangre,

bazos, y tejidos tumorales 1 día después de la segunda inyección de anticuerpo. Los bazos se procesaron dentro de una suspensión unicelular por medio de disociación mecánica a través de un colador de células de 70 µm. Las células se lavaron con PBS y los glóbulos rojos se lisaron con tampón de lisis ACK. Subsiguientemente, las células se resuspendieron en tampón FACS que constaba de PBS/2%FBS y se prepararon para la tinción. De modo similar, los tejidos tumorales se procesaron dentro de suspensiones unicelulares con disociación mecánica y enzimática con el Disociador gentleMACS™ (Miltenyi Biotec). El homogeneizado de tejido se filtró a través de un colador de células de 70 µm y se resuspendió en tampón FACS que constaba de PBS/2%FBS para la tinción. Las células de sangre periférica se trataron con tampón de lisis ACK para lisar RBCs y se resuspendieron en tampón FACS que constaba de PBS/2%FBS. Las células se tiñeron con el siguiente panel:

TABLA 20

Marcador de Fluorocromo		Clon
PERCPCY5	CD3	SK7
PERCPCY5	CD19	HIB19
FITC	CD14	M5E2
PE-Cy7	CD11b	ICRF44
Alexa700	CD45 de humano	2D1
AmCyan	Vivo/MUERTO	
APC/DyL650	SIRPA	<i>interno</i>
BV421	CD16	3G8
BUV395	HLA-DR	L243
PE-CF594	CD163	GHI/61
PE	CD86	IT2.2
APC-Cy7	<i>CD45 de ratón</i>	<i>30-F11</i>

Se injertaron ratones NOG-EXL con células madre hematopoyéticas (HSC) CD34+ derivadas de sangre de cordón umbilical humano a partir de dos donantes diferentes (donantes A y B). A todos los ratones se les implantó por vía subcutánea con 3 millones de células de A375, una línea celular de melanoma humano. Los tumores crecieron hasta un volumen promedio de ~400 mm³ antes de la administración del anticuerpo. Los ratones recibieron dos inyecciones IP de anticuerpos anti-SIRPA con tres días de diferencia a 10 mg/kg. Los ratones de control recibieron 2 inyecciones IP de isotipo hulgG1 a 10 mg/kg. Se cosechó el tejido tumoral a partir de los ratones 1 día después de la administración de la segunda dosis de anticuerpo.

La **FIG. 19** muestra el diseño de estudio y los resultados de la regulación hacia abajo de SIRPA mediada por anticuerpos en ratones NOG-EXL humanizados portando tumores A375 en estos estudios. La **FIG. 19A** muestra que 8 ratones fueron injertados con CD34+ HSC a partir del donante A y 29 ratones fueron injertados con CD34+ HSC a partir del donante B. Brevemente, 40 ratones injertados con CD34+ HSC a partir de 2 donantes diferentes se procuraron de Taconic, NY. A las 10 semanas posteriores al injerto, se chequeó la calidad de los ratones antes del envío para la reconstitución de leucocitos humanos a través de citometría de flujo. La mayoría de los ratones (36/40) contenían >50% de células huCD45+ en sangre periférica.

Los macrófagos asociados a tumores en ratones NOG-EXL se definieron como células CD45+ CD11b+ CD14+ CD16+ CD3- CD19-. La FIG. 19B muestra el nivel de expresión de SIRPA en macrófagos tumorales humanos representado ya sea como valores de MFI (panel izquierdo) o valores normalizados (panel derecho). El tratamiento con anticuerpo anti-SIRPA resultó en una significativa regulación hacia abajo de SIRPA en macrófagos tumorales humanos a partir de ambos donantes en comparación con el grupo de control de isotipo. La

normalización de los valores de MFI para cada donante revela una reducción de la expresión de SIRPA ~70%, lo cual se aproxima a la extensión de la regulación hacia abajo que se observa en macrófagos derivados de monocitos *in vitro* y en macrófagos tumorales en ratones transgénicos BAC. No se observó una diferencia significativa en la actividad entre la variante de Fc de anti-SIRPA 3F9-22 PS y la variante de Fc de NSLF del anticuerpo anti-SIRPA en estos experimentos.

Además de la expresión de SIRPA, también se efectuó un perfil de macrófagos tumorales a partir de estos experimentos para examinar la expresión de los marcadores M1. Los macrófagos tumorales se definieron como células huCD45+ huCD11b+ CD14+ huCD16+. Como se muestra en la **FIG. 20A**, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación regularon hacia arriba la expresión de HLA-DR. La normalización de los valores de MFI para cada donante demostró que la variante de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 PS aumentó la expresión de HLA-DR ~3-veces en ambos donantes por encima de aquéllo observado con el tratamiento con anticuerpo de control de isotipo. En contraste, la variante de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 NSLF Fc aumentó la expresión de HLA-DR ~1,5-2-veces por encima de aquéllo observado con el tratamiento con anticuerpo de control de isotipo. Solamente el aumento medido en los macrófagos del Donante B alcanzó significancia estadística con la variante de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 NSLF. De modo similar, los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación aumentaron la expresión de CD86 en los macrófagos tumorales a partir del Donante B solamente (**FIG. 20B**). A pesar de que ambas variantes de Fc PS y NSLF Fc aumentaron la expresión de CD86 en ~40% en relación con el grupo de anticuerpo de control de isotipo, solamente la variante de Fc Ps logró significancia estadística para la expresión aumentada de CD86. Estos resultados demostraron ambas variantes de Fc PS y NSLF del

anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 regularon hacia abajo a SIRPA y aumentaron los marcadores M1 en los macrófagos tumorales humanos; sin embargo, la variante PS parece parcialmente más potente que la variante NSLF en estos experimentos.

La regulación hacia abajo de SIRPA mediada por anticuerpos también se evaluó en monocitos de sangre periférica y en monocitos esplénicos con el objeto de comparar la actividad de los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación en compartimentos inmunes periféricos y tumorales. Las poblaciones de monocitos humanos se definieron como células CD45+ CD11b+ CD14+ CD16- CD3- CD19-. Los ratones recibieron dos inyecciones IP de anticuerpos anti-SIRPA con tres días de diferencia a 10 mg/kg. Los ratones de control recibieron 2 inyecciones IP de anticuerpo de control hulgG1 a 10 mg/kg. Los bazo y la sangre se cosecharon a partir de los ratones 1 día después de la administración de la segunda dosis de anticuerpo. Como se muestra en la **FIG. 21A**, la variante de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 NSLF exhibió una regulación hacia abajo superior de SIRPA en comparación con aquello que se observó con la variante de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 PS en los monocitos esplénicos. Sin embargo, en los monocitos de sangre periférica, ambas variantes de Fc desplegaron una actividad similar (**FIG. 21B**). Los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación mostraron una mayor regulación hacia abajo del receptor en los monocitos derivados a partir del Donante B que del Donante A, lo cual se puede correlacionar con una más alta expresión de línea de base de SIRPA en los monocitos en el Donante B que del Donante A.

Tomados en conjunto, estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación son efectivos en la regulación hacia abajo de los niveles de SIRPA en ambos monocitos de sangre periférica así como también en los monocitos esplénicos.

EJEMPLO 19: Los anticuerpos anti-SIRPA sometidos a ingeniería para el acoplamiento selectivo a FcR mantienen la actividad de regulación hacia abajo del receptor mediados por anticuerpos

Para evaluar más aún el rol de FcRs en la actividad de los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación, el dominio variable del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 se expresó con diferentes dominios de Fc con distintos perfiles de unión a FcR. Las mediciones de afinidad de FcR para las variantes de Fc de anticuerpo anti-SIRPA se obtuvieron utilizando interferometría de biocapa (BLI) sobre un instrumento Pall ForteBio Octet RED96. El anticuerpo Fab-CH1 anti-humano inmovilizado capturó las variantes de Fc de anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 humanizado en biosensores (10 µg/mL, tiempo de carga 300 s). Se llevaron a cabo cinéticas de ciclo único con 100 nM de FcRs de humano soluble fluido sobre el anticuerpo capturado para registrar las trazas (tiempo de asociación 300 s, tiempo de disociación 300 s). El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando ForteBio Data Analysis Software, versión 9.0. Se utilizó tampón cinético estándar (PBS, 0,1% BSA, 0,02% Tween-20, pH 7,2) para el ensayo y para preparar los reactivos.

Las mediciones de afinidad relativa derivadas a partir del análisis de ajuste de curvas de los sensorgramas obtenidos a partir de estos experimentos se sintetizan a continuación en la **Tabla 19**. Las variantes de Fc desplegadas predijeron patrones de unión a FcR. Por ejemplo, las mutaciones de Fc LALAPS anularon la unión a todos los FcRs, excepto el receptor de alta afinidad, FcγR1. Las mutaciones de Fc N325S/L328F (NSLF) específicamente eliminaron la unión a FcγR3A de humano. De modo similar, los isotipos IgG2 e IgG4 fallan en unirse a FcγR3A y solamente IgG4 mantiene la unión a FcγR1.

TABLA 19

Variante de Fc	FcgR1	FcgR2A H131	FcgR2A R131	FcgR2B	FcgR3A F158	FcgR3A V158
IgG1 LALAPS	+	-	-	-	-	-
IgG1 NSLF	++	+	++	++	-	-
IgG2	-	+	+	-	-	-
IgG 4 SP	++	+	++	++	-	-

Las variantes de Fc de anticuerpos anti-SIRPA 3F9-22 subsiguientemente se evaluaron por su capacidad para regular hacia abajo los niveles o la expresión de SIRPA en macrófagos derivados de monocitos humanos. Como se describió previamente, se aislaron monocitos humanos a partir de la sangre periférica de donantes sanos y se diferenció dentro de los macrófagos *in vitro* mediante el suplemento de medios de crecimiento con M-CSF de humano. Luego de la diferenciación, se cosecharon macrófagos humanos y se sembraron sobre placas de cultivo tisular de 96 pocillos con una concentración en aumento de anticuerpo de control o de anticuerpos anti-SIRPA solubles y se incubó durante la noche a 37°C. Las células se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de superficie celular de SIRPA utilizando un anticuerpo anti-SIRPA de humano conjugado-DyLight650 que pertenece a una bandeja de epítipo separada que aquélla del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22.

Como se muestra en la **FIG. 22** y se sintetiza en la **Tabla 20**, la mayoría de las variantes de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 máximamente regularon hacia abajo los niveles de superficie celular de SIRPA en los macrófagos con valores de IC50 similares. Sin embargo, el anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 LALAPS solamente en parte reguló hacia abajo los niveles de superficie celular de SIRPA, confirmando que el acoplamiento de FcR está involucrado en la potenciación de esta actividad de los anticuerpos anti-SIRPA. Adicionalmente, dado que las variantes de Fc que no se unen a FcgR3A demuestran una similar regulación

hacia abajo del receptor a la del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 PS, el cual se une a todos los FcRs, se sugiere que el acoplamiento de FcγR3A sea prescindible para la internalización del receptor mediada por anticuerpos.

TABLA 20

Variante de Fc	IC50 (nM)	Máx %DR
3F9-22 PS	0,04701	73,825
3F9-22 LALAPS	0,04468	41,575
3F9-22 NSLF	0,045125	74,61
3F9-22 IgG2	0,02185	67,955
3F9-22 IgG4	0,032415	70,455

EJEMPLO 20: *Los anticuerpos anti-SIRPA sometidos a ingeniería para el acoplamiento selectivo a FcR mejoran la fagocitosis de las células tumorales por los macrófagos*

Además de la regulación hacia abajo del receptor mediada por anticuerpos según se divulgó anteriormente, se evaluó el rol de FcRs en el mejoramiento de la fagocitosis de las células tumorales mediada por el anticuerpo anti-SIRPA con diferentes variantes de Fc del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22. Adicionalmente, la actividad fagocítica para otros anticuerpos que se focalizan en esta vía se evaluó en paralelo.

Se trataron macrófagos humanos primarios durante la noche con anticuerpo de control o con el anticuerpo de ensayo indicado. Las células tumorales se etiquetaron con tinte CFSE y se adicionaron a los macrófagos a 37°C durante la noche. Al día siguiente, se recolectaron los macrófagos y se tiñeron sobre hielo con anti-CD14 APC en tampón FACS que contenía anticuerpos de bloqueo de FcR. Se midió la actividad fagocítica por medio del recuento del porcentaje de macrófagos doble positivo CD14/CFSE.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la **FIG. 23** y se presentan como el aumento en veces en el porcentaje de la población de macrófagos doble positivo CD14/CFSE. Como se muestra en la **FIG. 23** y se sintetiza a continuación en la **Tabla 21**, ambas variantes de anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 PS y anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 NSLF mejoraron de modo significativo la fagocitosis de las células de melanoma A375 en relación con aquéllo observado en los macrófagos tratados con anticuerpo de control. El observado mejoramiento de la fagocitosis pareció comparable con el anticuerpo anti-CD47 ensayado en estos estudios (aCD47), el cual funciona principalmente mediante la opsonización de las células tumorales que expresan CD47 para ADCP. En contraste, dos diferentes anticuerpos anti-SIRPA de bloqueo a CD47 KWAR23 (Véase WO2015/138600) y 18D5 (Véase WO2017/178653) fallaron en demostrar cualquier mejoramiento de la fagocitosis de células tumorales. Estos resultados demostraron que ambas variantes de Fc PS y NSLF del anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 mantuvieron las propiedades de mejoramiento de la fagocitosis de las células tumorales en ausencia de anticuerpos de antígenos antitumorales de opsonización. Dado que los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación son no bloqueantes con respecto a la interacción SIRPA/CD47, estos resultados también mostraron que los anticuerpos anti-SIRPA no bloqueantes de la presente divulgación fueron efectivos para aumentar o mejorar la fagocitosis de las células tumorales en comparación con aquéllo observado con los anticuerpos anti-SIRPA no bloqueantes KWAR23 y 18D5.

TABLA 21

Anticuerpo	EC50 (nM)	Máx*
3F9-22PS	0,1144575	2,06925
3F9-22NSLF	0,457625	1,774
KWAR23	0,3631	1,126

18D5	2,148	1,06446667
aCD47	0,777775	2,6235

*Incremento en veces en la fagocitosis sobre la actividad de línea de base

EJEMPLO 21: Las variantes de anticuerpos anti-SIRPA 3F9-22 no inducen cambios en los recuentos de glóbulos rojos y plaquetas

Los informes han indicado que el anticuerpo anti-CD47 5F9 administrado a primates no humanos resultó en anemia (Liu et al, 2015, PLOS ONE, DOI:10.1371/diario.pone.0137345) y que la administración de anti-SIRPAFc TTI-621 a humanos resultó en disminuciones en las plaquetas dependientes de las dosis (Ansell et al, 2016, Sangre 128:1812). Para examinar si los anticuerpos anti-SIRPA de la presente divulgación tienen algún efecto sobre los recuentos de glóbulos rojos o sobre los recuentos de plaquetas *in vivo*, se llevaron a cabo los siguientes estudios. Fueron asignados monos cynomolgus hembra a cinco grupos y se les administró anticuerpo de control, anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 PS, anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 IgG4, anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 IgG2, o anticuerpo anti-SIRPA 3F9-22 NSLF, según se indica en la **Tabla 22** a continuación. A los animales se les administraron los anticuerpos por medio de infusión intravenosa a través de la vena vena safena.

TABLA 22

Grupo	Número de Hembras	Artículo de Prueba	Vía de la Dosis	Nivel de Dosis Blanco (mg/kg)	Concentración de Dosis Blanco (mg/mL)	Volumen de Dosis Blanco (mL/kg)
1	3	IgG	IV	10	2,5	4
2	3	3F9-22 PS	IV	10	2,5	4
3	3	3F9-22 IgG4	IV	10	2,5	4
4	3	3F9-22 IgG2	IV	10	2,5	4
5	3	3F9-22 NSLF	IV	10	2,5	4

IV = Intravenosa; proporcionada como una inyección de bolo.

Notas: Los animales en los Grupos 1 y 2 fueron dosificados una vez en los Días 1, 8, 15, 22, y 29 (total de 5 dosis).

Los animales en los Grupos 3, 4, y 5 fueron dosificados una vez en los Días 1 y 29 (total de 2 dosis).

La sangre se recolectó a partir de los animales por medio de una vena femoral para los recuentos de glóbulos rojos (RBC) y los recuentos de plaquetas una vez durante la fase de predosis y luego a aproximadamente 72, 168, 240, 408, 576, 672, y 744 horas posteriores a la administración del anticuerpo.

Como se muestra en la **FIG. 24**, los recuentos de glóbulos rojos y plaquetas no fueron alterados por ninguno de los anticuerpos anti-SIRPA 3F9-22 PS, 3F9-22 IgG4, 3F9-22 IgG2, y 3F9-22 NSLF a través del curso de estos experimentos.

Ciertas secuencias de anticuerpos anti-SIRPA adicionales de la presente divulgación se muestran a continuación. Los aminoácidos subrayados indican ciertas diferencias en las secuencias de aminoácidos de los siguientes anticuerpos anti-SIRPA.

Cadena Pesada de 3F9-22-IgG1 WT (SEQ ID NO:47)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSIAMSWVRQAPGKGLEWVATISEIGGSITII
AESVKGRFTISRDN SKNTLILQMNSLRAEDTAVIICARPPIDDIIGGFQIWGQGTLLTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDIFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LISLSSVVTVPSSSLGTQTIICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWIVDGVEVHNAKTKPREEQINSTI
RVVSVLTVLHQDWLNGKEIKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVITLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFIPSDIAVEWESNGQPENNIKTTPVLDSDGSFFLISKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMEALHNHITQKSLSLSPGK

Cadena Pesada de 3F9-22 hulG1 PS (SEQ ID NO:48)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSIAMSWVRQAPGKGLEWVATISEIGGSITIIAESVK
GRFTISRDN SKNTLILQMNSLRAEDTAVIICARPPIDDIIGGFQIWGQGTLLTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDIFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLISLSSVVTVPSSSL

GTQTIICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWIVDGVEVHNAKTKPREEQINSTIRVVSVLTVLHQDWLNGKEIKCKVSN
KALPASIEKTISKAKGQPREPQVITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFIPSDIAVEWESNGQPENNI
KTTTPVLDSDGSFFLISKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHITQKSLSLSPGK

Cadena Pesada de 3F9-22 SELF (SEQ ID NO:49)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSIAMSWVRQAPGKGLEWVATISEIGGSITIIAESVK
GRFTISRDN SKNTLILQMNSLRAEDTAVIIICARPPIDDIIGGFQIWGQGT LVT VSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDIFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLISLSSVVTVPSSSL
GTQTIICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVEHEDPEVKFNWIVDGVEVHNAKTKPREEQINSTIRVVSVLTVLHQDWLNGKEIKCKVSN
KAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFIPSDIAVEWESNGQPENNI
KTTTPVLDSDGSFFLISKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHITQKSLSLSPGK

Cadena Pesada de 3F9-22 hlgG1 NSLF (SEQ ID NO:53)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYIAESVK
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYGGFQYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
KAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena Pesada de 3F9-22 hlgG1 LALAPS (SEQ ID NO:54)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYIAESVK
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYGGFQYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena Ligera de 3F9-22 hulg1 (SEQ ID NO:50)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASKSVSSGGISIMHWIQQKPGKAPKLLIILASNLESGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATIICQHNRELPVTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFIPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTISLSSTLTLSKADIEKHKVIAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena Pesada de 3F9-14 hulg1 WT (SEQ ID NO:51)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSIAMSWVRQAPGKGLEWVATISEIGGSITIIAESVK
GRFTISRDNSKNTLILQMNSLRAEDTAVIICARPPIDDIIGGFRIWGGTLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDIFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLISLSSVTVTPSSSL
GTQTIICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWIVDGVEVHNAKTKPREEQINSTIRVSVLTVLHQDWLNGKEIKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFIPSDIAVEWESNGQPENNI
KTTTPVLDSDGSFFLISKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHITQKSLSLSPGK

Cadena Pesada de 3F9-14 PS (SEQ ID NO:57)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYIAESVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYGGFRYWGQTLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena Pesada de 3F9-14 SELF (SEQ ID NO:52)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSIAMSWVRQAPGKGLEWVATISEIGGSITIIAESVK
GRFTISRDNSKNTLILQMNSLRAEDTAVIICARPPIDDIIGGFRIWGGTLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDIFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLISLSSVTVTPSSSL
GTQTIICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVEHEDPEVKFNWIVDGVEVHNAKTKPREEQINSTIRVSVLTVLHQDWLNGKEIKCKVSN

KAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFIPSDIAVEWESNGQPENNI
KTTTPVLDSDGSFFLISKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHITQKSLSLSPGK

Cadena Pesada de 3F9-14 NSLF (SEQ ID NO:55)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAAESVK
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYGGFRYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSS
KAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena Pesada de 3F9-14 LALAPS (SEQ ID NO:56)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISEYGGSYTYAAESVK
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPPYDDYGGFRYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena Ligera de 3F9-14 hulgG1 (SEQ ID NO:50)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSSGGISIMHWIQQKPGKAPKLLIILASNLESGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSVQPEDFATIICQHNRELPVTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFIPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTISLTLSKADIEKHKVIACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC