

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 647**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2013 PCT/US2013/021937**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013 WO13109752**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2013 E 13738232 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 2804617**

54 Título: **Reactivos SIRP-alfa de alta afinidad**

30 Prioridad:

17.01.2012 US 201261587247 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.04.2021

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
Office of the General Counsel, Building 170, Third
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**RING, AARON MICHAEL;
GARCIA, KENAN CHRISTOPHER;
WEISKOPF, KIPP ANDREW;
LEVIN, ARON M. y
WEISSMAN, IRVING L.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 816 647 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Reactivos SIRP-alfa de alta afinidad

5 Antecedentes de la invención

La renovación de las células comienza con la inducción de un programa apoptótico u otros cambios celulares que los marcan para su eliminación y el posterior reconocimiento de los marcadores por los fagocitos, incluyendo macrófagos, células dendríticas y similares. Este proceso requiere una eliminación específica y selectiva de células no deseadas. La discriminación de las células sanas de las células no deseadas/envejecidas/moribundas muestra marcadores o ligandos llamados señales de "cómeme", es decir, "auto alteradas", que a su vez pueden reconocerse por los receptores en los fagocitos. Las células sanas pueden mostrar señales de "no me comas" que inhiben activamente la fagocitosis; estas señales se regulan negativamente en las células moribundas o se presentan en una conformación alterada. La proteína de superficie celular CD47 en células sanas y su compromiso de un receptor de fagocitos, SIRP α , constituye una señal clave de "no me comas" que puede detener el involucramiento mediado por múltiples modalidades, incluyendo eliminación de células apoptóticas y fagocitosis mediada por FcR. Bloquear el compromiso mediado por CD47 de SIRP α en un fagocito, o la pérdida de expresión de CD47 en ratones de inactivación génica, puede provocar la eliminación de células vivas y eritrocitos no envejecidos. De manera alternativa, bloquear el reconocimiento de SIRP α también permite la inmersión de dianas que normalmente no se fagocitan.

CD47 es una glucoproteína transmembrana ampliamente expresada con un solo dominio similar a Ig y cinco regiones que abarcan la membrana, que funciona como un ligando celular para SIRP α con unión mediada a través del dominio tipo NH₂-terminal V de SIRP α . SIRP α se expresa principalmente en células mieloides, incluyendo macrófagos, granulocitos, células dendríticas mieloides (DC), mastocitos y sus precursores, incluyendo células madre hematopoyéticas. Los determinantes estructurales en SIRP α que median la unión a CD47 se analizan por Lee *et al.* (2007) J. Immunol. 179:7741-7750; Hatherley *et al.* (2007) J.B.C. 282:14567-75; y el papel de la dimerización cis de SIRP α en la unión de CD47 se analiza por Lee *et al.* (2010) J.B.C. 285:37953-63.

De acuerdo con el papel de CD47 para inhibir la fagocitosis de las células normales, existe evidencia de que está regulada de forma transitoria en células madre hematopoyéticas (HSC) y progenitoras justo antes y durante su fase migratoria, y que el nivel de CD47 en estas células determina la probabilidad de que se engullan *in vivo*. CD47 también está constitutivamente regulado positivamente en una serie de cánceres. La sobreexpresión de CD47 por las células tumorales puede aumentar la patogenicidad al permitir que la célula evada la fagocitosis.

Los documentos WO 2010/130053 A1 y WO 2009/046541 A1 describen métodos para modular la interacción SIRP α -CD47 mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido SIRP α que carece del dominio transmembrana SIRP α capaz de unirse al dominio extracelular de CD47 humano en el tratamiento del cáncer hematológico y para aumentar el injerto de células madre hematopoyéticas, respectivamente.

40 Sumario de la invención

La invención es como se define en el presente documento por las reivindicaciones.

Se proporcionan polipéptidos SIRP α de alta afinidad y análogos de los mismos, que se denominan en el presente documento reactivos SIRP α de alta afinidad. Los reactivos son variantes de secuencia de la proteína SIRP α humana nativa, y tienen utilidad para métodos *in vivo* e *in vitro* que bloquean la interacción entre la proteína SIRP α nativa y su receptor, CD47. Los cambios de aminoácidos que proporcionan una mayor afinidad se localizan en el dominio d1, y por lo tanto, los reactivos SIRP α de alta afinidad de la divulgación comprenden un dominio d1 de SIRP α humano, con al menos un cambio de aminoácido con respecto a la secuencia de tipo silvestre dentro del dominio d1. Un reactivo SIRP α de alta afinidad tal opcionalmente comprende secuencias de aminoácidos adicionales, por ejemplo secuencias de anticuerpos Fc; porciones de la proteína SIRP α humana de tipo silvestre que no sea el dominio d1, incluyendo sin limitación los restos 150 a 374 de la proteína nativa o fragmentos de la misma, habitualmente fragmentos contiguos con el dominio d1; y similares. Los reactivos SIRP α de alta afinidad pueden ser monoméricos o multiméricos, es decir, dímero, trímero, tetramero, etc.

La divulgación proporciona reactivos SIRP α solubles de alta afinidad, que carecen del dominio transmembrana de SIRP α y comprenden al menos un aminoácido y no más de 15 cambios en el dominio d1 en relación con SIRP α humano de tipo silvestre, realizándose las modificaciones a los restos con respecto a los restos seleccionados del grupo que consiste en: L4, V6, A21, V27, 131, E47, K53, E54, H56, V63, S66, K68, V92, F94 y F103 de SEQ ID NO:1, donde dicho cambio de aminoácidos aumenta la afinidad del polipéptido SIRP α que se une a CD47 con respecto a la afinidad del polipéptido SIRP α humano de tipo silvestre. El polipéptido SIRP α de alta afinidad puede modificarse postraduccionalmente, por ejemplo por glucosilación, pegilación, etc. El reactivo SIRP α de alta afinidad puede ser una proteína de fusión que comprende un dominio Fc.

La divulgación también incluye formulaciones farmacéuticas de reactivos SIRP α de alta afinidad en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichas formulaciones pueden proporcionarse como una dosis unitaria,

por ejemplo, una dosis eficaz para aumentar la fagocitosis dirigida en un individuo. Las formulaciones farmacéuticas también incluyen preparaciones liofilizadas u otras de los reactivos SIRP α de alta afinidad, que pueden reconstituirse para su uso.

5 Se proporcionan métodos para manipular la fagocitosis dirigida de las células, por ejemplo, por macrófagos u otras células fagocíticas de mamíferos. En dichos métodos, una célula que expresa CD47 se pone en contacto con un reactivo SIRP α de alta afinidad de la divulgación en una dosis eficaz para bloquear la interacción entre SIRP α endógeno y CD47. El bloqueo de esta interacción permite el engullimiento de dianas que normalmente no se fagocitan. La puesta en contacto puede realizarse *in vivo*, por ejemplo, con fines terapéuticos, e *in vitro*, por ejemplo, para
10 ensayos de cribado y similares. El reactivo SIRP α de alta afinidad para estos fines puede ser multimérico; o monomérico. Los reactivos monoméricos encuentran un uso particular para la administración en combinación con un anticuerpo que se une selectivamente a la célula marcada como diana para la fagocitosis.

15 Las células tumorales, por ejemplo, tumores sólidos tales como carcinomas, sarcomas, melanomas, etc.; leucemias; linfomas, etc. pueden dirigirse como diana para la fagocitosis al poner en contacto la célula tumoral con una dosis de un polipéptido SIRP α de alta afinidad que sea eficaz para bloquear o enmascarar CD47 en la superficie celular, permitiendo el engullimiento de dianas que normalmente no se fagocitan. La administración de una dosis eficaz de polipéptido SIRP α de alta afinidad a un paciente evita la interacción entre CD47 y SIRP α , lo que aumenta la eliminación de las células tumorales a través de la fagocitosis. Para estos fines, puede ser ventajoso administrar una variante
20 SIRP α de alta afinidad en presencia de un Fc de inmunoglobulina unido a la célula marcada como diana para la fagocitosis, que proporciona una señal pro-fagocítica. En estos aspectos, el polipéptido SIRP α de alta afinidad puede combinarse con anticuerpos monoclonales dirigidos contra uno o más marcadores de células tumorales adicionales, cuyas composiciones pueden ser sinérgicas para mejorar la fagocitosis y la eliminación de células tumorales en comparación con el uso de agentes únicos. Los reactivos monoméricos de alta afinidad SIRP α son ventajosos para
25 este fin ya que tienen baja toxicidad de glóbulos rojos. Alternativamente una construcción de fusión SIRP α que comprende una región Fc de inmunoglobulina, por ejemplo, una que proporciona una señal pro-fagocítica, puede administrarse.

30 El reactivo SIRP α de alta afinidad puede comprender un marcador detectable. Un reactivo marcado puede usarse para propósitos de formación de imagen *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, en la formación de imagen de un tumor.

Breve descripción de los dibujos

35 Figuras 1A-1E. Evolución dirigida de variantes de SIRP α de alta afinidad. A. Esquema del bloqueo de CD47 por SIRP α soluble de alta afinidad. (Izquierda) En el estado basal, la expresión de CD47 en células cancerosas activa SIRP α en macrófagos, iniciando una cascada inhibitoria a través de las tirosina fosfatasas SHP 1 y 2 y previniendo la fagocitosis de células cancerosas. (Derecha) La proteína SIRP α de alta afinidad soluble, antagoniza competitivamente a CD47 y evita la interacción con SIRP α en los macrófagos, desinhibiendo de esta manera la fagocitosis. B. Representación esquemática de la presentación en superficie de levadura del dominio de Ig SIRP α V-set (dominio 1, d1). Los clones de levadura (células grises) presentan diferentes variantes de SIRP α (protuberancias de color). El recuadro indica la unión de SIRP α a la superficie celular de la levadura mediante fusión con Aga2 y selección con CD47 biotinilado. C. Resumen de secuencias y mediciones de afinidad SPR de variantes de SIRP α diseñadas por ingeniería. La posición de los restos mutados y su secuencia correspondiente en el alelo 1 de tipo silvestre se indica en la parte superior de la tabla. El color rojo del texto indica las mutaciones consenso y el sombreado azul indica los restos de contacto en el
45 consenso. A la derecha se muestran sensorgramas SPR representativos de SIRP α de tipo silvestre y variante de alta afinidad FD6 que se une a CD47 inmovilizado. UR = unidades de respuesta. D. La estructura cristalina del complejo FD6:CD47 representada como superficies transparentes que contienen representaciones de cinta de FD6 (naranja) y CD47 (azul). E. Superposición de los complejos SIRP α :CD47 de tipo silvestre (magenta) y de alta afinidad (verde). Los recuadros muestran restos de contacto mutados en el bucle SIRP α C'D (barras) y la interfaz de unión de CD47
50 (arriba, relleno de espacio; abajo, barras).

Figuras 2A-2H. Las variantes de SIRP α de alta afinidad bloquean CD47 y estimulan la fagocitosis *in vitro*. A. Curvas de respuesta a dosis del antagonismo de CD47 en células de linfoma Raji con alelo 1 de SIRP α de tipo silvestre (a1TS, rosa), fragmentos Fab anti-clon CD47 B6H12 (naranja) o dos variantes SIRP α de alta afinidad (FD6, CV1, verde).
55 Células teñidas con concentraciones de titulación de agentes bloqueantes de CD47 en competición con el tetrámero SIRP α de tipo silvestre conjugado con Alexa Fluor 647 100 nM. B. Imágenes representativas de ensayos de fagocitosis realizados con células de linfoma Raji marcadas con CFSE y macrófagos RFP+ con control vehículo (PBS) o un mutante SIRP α de alta afinidad fusionado con IgG4 humana (CV1-hIgG4). Los recuadros muestran macrófagos que han ingerido múltiples células cancerosas. Barra de escala = 50 μ m. C. Gráficos representativos que muestran ensayos de fagocitosis analizados por citometría de flujo. Los macrófagos humanos se co-cultivaron con células GFP+ DLD-1 y los tratamientos indicados. Las ventanas de adquisición se usaron para evaluar los macrófagos GFP+ (rojo) como un porcentaje de la población total de macrófagos (azul). D. Fagocitosis de células tumorales GFP+ por macrófagos humanos derivados de donantes, según lo evaluado por citometría de flujo. Todos los tratamientos con proteínas se usan a 100 nM. El porcentaje de macrófagos GFP+ se normalizó a la respuesta máxima de cada donante
65 cada línea celular. E. Fagocitosis de células GFP+ DLD-1 con concentraciones variables de variantes SIRP α -Fc o un anticuerpo anti-CD47 compatible con el isotipo (clon B6H12). F. Fagocitosis de células GFP+ DLD-1 con

control de isotipo no específico (mIgG1), anticuerpos anti-CD47 (2D3) o anti-EpCam no bloqueantes. Todos los anticuerpos se usaron a 20 µg/ml. Se usaron monómeros FD6 TS SIRPα o variante SIRPα de alta afinidad a 1 µM y se combinaron como se indica. G. Fagocitosis de células GFP+ DLD-1 con concentraciones variables de cetuximab (anti-EGFR) solo (rojo) o en combinación con monómero TS SIRPα (rosa) o monómeros SIRPα de alta afinidad (verde). Todas las variantes de SIRPα se usan a 100 nM. H. Fagocitosis de células GFP+ Raji con concentraciones variables de rituximab (anti-CD20) solo (rojo) o en presencia de monómero TS SIRPα (rosa) o monómeros SIRPα de alta afinidad (verde). Todas las variantes de SIRPα se usaron a 100 nM. D-H Todos los ensayos de fagocitosis de macrófagos humanos se realizaron con macrófagos derivados de un mínimo de tres donantes de sangre independientes. Las barras de error indican desviación estándar. ns = no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente a variantes TS SIRPα (d,g,h), frente a B6H12-hlgG4 (e), o como se indique de otra manera.

Figuras 3A-3H. Las proteínas de fusión SIRPα-Fc de alta afinidad son eficaces como agentes únicos para el cáncer. A. Imagen representativa de células GFP-luciferasa+ DLD-1 injertadas en la cavidad peritoneal, que forman nódulos tumorales diseminados entre asas intestinales circundantes. B. Supervivencia de ratones injertados con células GFP-luciferasa+ DLD-1 tras el tratamiento con control vehículo (PBS, rojo) o proteína de fusión SIRPα-hlgG4 de alta afinidad (CV1-hlgG4, azul). C. Análisis representativo de Fc humano unido a la superficie de células sanguíneas enteras de animales tratados en b. D. Análisis de sangre de animales tratados en b que muestran desviación media y estándar de cuatro animales por cohorte a lo largo del tiempo. La línea de puntos muestra el límite inferior de los valores normales. E. Crecimiento de células de cáncer de vejiga GFP-luciferasa+ 639-V en el tejido subcutáneo dorsal de ratones NSG tras el tratamiento con las terapias indicadas evaluadas por formación de imagen de bioluminiscencia. Las barras representan valores medios, los puntos muestran valores de ratones individuales. F. Imágenes representativas de bioluminiscencia de ratones injertados con 639-V de cada grupo de tratamiento el día 37 después del injerto. G. Volúmenes tumorales de ratones injertados con 639-V en el día 38 después del injerto. Las barras representan valores medios, los puntos muestran valores de ratones individuales. H. Supervivencia de ratones injertados con células GFP-luciferasa+ 639V. AH. Las flechas negras marcan el inicio y la finalización del tratamiento diario. ns = no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ para tratamiento de control vehículo frente a CV1-hlgG4.

Figuras 4A-4F. Los monómeros SIRPα de alta afinidad mejoran la efectividad de los anticuerpos monoclonales *in vivo*. A. Crecimiento de tumores de linfoma de GFP-luciferasa+ Raji tras el tratamiento diario con PBS (rojo), monómero CV1 (naranja), rituximab (verde) o rituximab más monómero CV1 (azul), como se evalúa por formación de imágenes de luminiscencia. Las barras indican valores medios, los puntos indican valores de ratones individuales. B. Imágenes representativas de bioluminiscencia de ratones en el día 29 después del injerto. Los círculos rojos indican sitios de tumores primarios, la flecha roja indica el sitio de metástasis a los ganglios linfáticos axilares. C. Mediciones de volumen tumoral medio de ratones de A. Las barras de error representan la desviación estándar. D. Supervivencia de ratones portadores de linfoma de A. E. Crecimiento de tumores de linfoma GFP-luciferasa+ Raji tras tratamiento bisemanal con PBS (rojo), monómero CV1 (naranja), alemtuzumab (verde) o alemtuzumab más monómero CV1 (azul), según lo evaluado por las mediciones de volumen tumoral. Las barras indican valores medios, los puntos indican valores de ratones individuales. F. Supervivencia de ratones portadores de linfoma de E. A-F Las flechas negras indican el inicio y la finalización del tratamiento. ns = no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ para todos los grupos frente a rituximab+monómero CV1, o alemtuzumab solo frente a alemtuzumab+monómero CV1.

Figuras 5A-5B. Diseño de biblioteca y secuencias de selecciones de primera generación. A. Izquierda: Tabla de posiciones aleatorias de la biblioteca de 'resto de contacto' con posibles variantes de aminoácidos y la ubicación de las posiciones aleatorias dentro de SIRPα. Derecha: Ubicación y descripción de las posiciones aleatorizadas para la biblioteca de 'restos centrales' de no contacto. SIRPα se representa en verde, CD47 se representa en magenta y las posiciones aleatorias se representan como cadenas laterales que llenan el espacio. B. Resumen de secuencias de variantes de SIRPα obtenidas después de la primera generación de selecciones. La posición de los restos mutados y su secuencia correspondiente en el alelo 1 de tipo silvestre se indica en la parte superior de la tabla. El sombreado azul indica mutaciones de 'contacto' que se producen en la interfaz SIRPα:CD47. La fuente en cursiva indica mutaciones en posiciones que no fueron aleatorizadas en la biblioteca agrupada (Glu47 e His56).

Figura 6. Diseño de biblioteca de selecciones de segunda generación. Tabla de posiciones aleatorizadas y posibles aminoácidos para la biblioteca de segunda generación y la posición de los restos variables dentro de la estructura de SIRPα. SIRPα se representa en verde, CD47 se representa en magenta y las posiciones aleatorias se representan como cadenas laterales que llenan el espacio.

Figura 7. Mapa de densidad electrónica representativo del complejo FD6:CD47. Mapa de densidad electrónica $2mF_o - DF_c$ en contorno a $2,0\sigma$. Los restos de aminoácidos modelados se representan como barras, con los restos de FD6 en amarillo y los restos de CD47 en verde. El resto de ácido piroglutámico 1 de CD47 se indica como PCA1 por encima del resto y la densidad correspondientes.

Figuras 8A-8C. Las variantes de SIRPα de alta afinidad se unen y bloquean CD47 de manera potente en las células cancerosas. A. Curvas de titulación de monómero de alelo 1 SIRPα de tipo silvestre (a1TS mono, rosa), tetrámero de alelo 1 SIRPα de tipo silvestre (tetrámero a1TS, granate) o variantes de SIRPα de alta afinidad (FD6, FA4, verde) que se une a las células de leucemia de Jurkat. Las barras de error indican la desviación estándar. B. Ensayo de bloqueo de CD47 en células Jurkat. Los antagonistas de CD47 se añadieron en competición con el tetrámero SIRPα de tipo

silvestre conjugado con Alexa Fluor 647. El bloqueo se probó con un mutante SIRP α de primera generación como un monómero (1A5 mono, verde azulado), un mutante SIRP α de segunda generación como un monómero (FD6 mono, verde), un mutante SIRP α de segunda generación como una fusión Fc con IgG4 humana (FD6-hlgG4, azul) y el clon B6H12 anti-CD47 (naranja). Las barras de error indican la desviación estándar. C. Unión de proteínas SIRP α -Fc de tipo silvestre (a1TS-hlgG4, rosa; a2TS-hlgG4, púrpura), Proteínas SIRP α -Fc de alta afinidad (FD-hlgG4, CV1-hlgG4, verde) y el anticuerpo anti-CD47 clon B6H12 (B6H12-hlgG4, naranja) a las células de cáncer de colon DLD-1.

Figura 9. Las variantes SIRP α -Fc de alta afinidad restringen el crecimiento de las células de cáncer de colon DLD-1 *in vivo*. Curvas de crecimiento tumoral tras el tratamiento con vehículo (PBS, rojo) o proteína de fusión SIRP α -hlgG4 de alta afinidad (CV1-hlgG4, azul), como se mide por imágenes de bioluminiscencia de las cavidades peritoneales de ratones tratados. Los puntos indican valores de ratones individuales, las líneas representan valores medios. ** $p < 0,01$ por ANOVA de 2 vías con prueba posterior de Bonferroni.

Figuras 10A-10D. El tratamiento con variantes Fc de SIRP α -de alta afinidad provoca infiltración de macrófagos y afecta a los índices de glóbulos rojos. A. Masa de tejido subcutáneo palpable disecada de un ratón tratado con CV1-hlgG4. Izquierda = luz blanca, derecha = fluorescencia GFP. Los óvalos discontinuos rodean dos nódulos tumorales superficiales, los asteriscos marcan el infiltrado estromal rico en macrófagos. Barra de escala = 5 mm. B. Tinción con hematoxilina y eosina de una masa de tejido subcutáneo palpable de un ratón tratado con CV1-hlgG4, demostrando la presencia de macrófagos infiltrantes. Se ve un nódulo tumoral en la parte superior izquierda de la imagen con un infiltrado inflamatorio que lo rodea. El recuadro muestra macrófagos representativos en el área marcada por el cuadro discontinuo. C. Tinción inmunohistoquímica para F4/80, un marcador de macrófagos de ratón, en masa de tejido subcutáneo palpable de un ratón tratado con CV1-hlgG4. Se ve un nódulo tumoral en la parte derecha de la imagen, con macrófagos infiltrantes teñidos a la izquierda. El recuadro muestra macrófagos representativos en el área marcada por el cuadro discontinuo, con evidencia de macrófagos en el proceso de fagocitosis (flechas negras) y el engullimiento exitoso de células tumorales (flechas rojas). D. Análisis de sangre de ratones con tumores de vejiga GFP-luciferasa+639-V el día 34 después del injerto. El tratamiento con CV1-hlgG4 produjo una disminución moderada en los índices de glóbulos rojos (amarillo). No se observó toxicidad para otros linajes sanguíneos.

Figuras 11A-11C. El tratamiento con monómeros SIRP α de alta afinidad no provoca toxicidad de los glóbulos rojos. A. Mediciones de hematocrito de ratones durante el transcurso del tratamiento con las terapias indicadas. B. Niveles de hemoglobina de ratones durante el transcurso del tratamiento con las terapias indicadas. C. Recuentos absolutos de glóbulos rojos de ratones en el transcurso del tratamiento con las terapias indicadas. A-C. ns = no significativo. Las flechas negras indican el inicio y la finalización del tratamiento diario.

Figura 12. Las variantes de SIRP α de alta afinidad exhiben seguridad en primates no humanos. Los macacos cangrejeros fueron tratados con una inyección intravenosa única de SIRP α -Fc de alta afinidad (FD6-hlgG4, rojo) o una serie de escalada de dosis de monómero SIRP α de alta afinidad (FD6 mono, azul). Las líneas de puntos representan días de tratamiento con las dosis indicadas anteriormente en mg/kg. Se observó una toxicidad moderada para los glóbulos rojos como una caída en el hematocrito tras el tratamiento con FD6-hlgG4, y no se observó pérdida de glóbulos rojos con la terapia con monómero FD6. No se observó toxicidad para otros sistemas de órganos.

Figuras 13A-13C. Las variantes de SIRP α de alta afinidad radiomarcadas son eficaces como agentes de formación de imagen no invasivos para el cáncer. A. Los ratones NSG se injertaron subcutáneamente con células de cáncer de colon humano DLD-1 en el flanco superior derecho. Los ratones portadores de tumor se inyectaron con monómero FD6 marcado con Cu-64 y se tomaron imágenes por exploración PET. Las puntas de flecha roja indican la absorción por el tumor, las puntas de flecha negra indican la absorción por los riñones. Los paneles superiores muestran imágenes dorsales y los paneles inferiores muestran secciones transversales a través de tumores. M2, M3 representan imágenes de dos animales independientes. B. Cuantificación de la señal de los animales a lo largo del tiempo. FD6 persiste en el tumor durante al menos 24 horas. C. Tabla que muestra la presencia de FD6 radiomarcado en tumores y tejidos normales. T:N = relación de absorción en el tumor con respecto al tejido indicado. ID/g = dosis inyectada por gramo de tejido.

Figuras 14A-14F. La clasificación celular de macrófagos activada por fluorescencia demuestra que las variantes de SIRP α de alta afinidad inducen la fagocitosis de las células cancerosas. A Los macrófagos humanos primarios y las células de cáncer de colon GFP+ DLD-1 se cultivaron conjuntamente en presencia de CV1-hlgG4 100 nM. La fagocitosis se cuantificó como el porcentaje de macrófagos CD45+ que se convirtió en GFP+. Las poblaciones de macrófagos se clasificaron por citometría de flujo para aquellas que fueron GFP negativas (azul), GFP bajas (rojo) o GFP altas (verde). B Los macrófagos ordenados con GFP alto contienen células tumorales envueltas como se visualiza por microscopía bajo luz transmitida en campo claro (imagen superior) y luz fluorescente (imagen inferior; rojo = CD45, verde = GFP). C Tinción de Wright-Giemsa de células de cáncer de colon DLD-1. D Tinción de Wright-Giemsa de poblaciones clasificadas de macrófagos negativos a GFP que carecen de material engullido. E Tinción de Wright-Giemsa de poblaciones clasificadas de macrófagos bajos en GFP enriquecidas para material engullido. F Tinción de Wright-Giemsa de poblaciones clasificadas de macrófagos con alto contenido de GFP que contienen células tumorales engullidas. La barra de escala BF representa 100 μ m.

Figura 15. Las variantes SIRP α de alta afinidad se sinergizan con trastuzumab para el cáncer de mama Her2+. Los

macrófagos humanos primarios se co-cultivaron con células de cáncer de mama GFP+ SK-BR-3 y las terapias indicadas. La fagocitosis se evaluó mediante citometría de flujo. La adición de monómero SIRP α de alta afinidad FD6 o CV1 a trastuzumab aumentó la fagocitosis. ns = no significativo, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ frente a los tratamientos control o los tratamientos de SIRP α de tipo silvestre en combinación con trastuzumab.

5 Figuras 16A-D: Las variantes de SIRP α de alta afinidad inducen máxima efectividad en presencia de cadenas Fc de anticuerpos unidos a tumores. A. Esquema que muestra variantes de SIRP α de alta afinidad. B Filtración analítica en gel que muestra que las proteínas de fusión SIRP α -Fc de alta afinidad se purifican como una sola especie (volumen de elución = 13,44) con agregación limitada. C Ensayo de fagocitosis con macrófagos de ratón RFP+ y células Raji de linfoma humano GFP+. El bloqueo de CD47 con monómero CV1 de variante SIRP α de alta afinidad o fragmentos Fab anti-CD47 produjo aumentos marginales en la fagocitosis, mientras que el tratamiento con SIRP α -Fc de alta afinidad o anticuerpos anti-CD47 intactos produjeron una fagocitosis elevada. D La oligomerización de CD47 no induce fagocitosis. Ensayo de fagocitosis realizado con macrófagos humanos primarios y células de cáncer de colon humano GFP+ DLD-1. El tratamiento con dímeros SIRP α de alta afinidad que carecen de un estímulo pro fagocítico no induce niveles sustanciales de fagocitosis.

Figuras 17A-17D: Las variantes de SIRP α de alta afinidad se unen y bloquean otros ortólogos de CD47 de mamíferos. A. Unión de la variante SIRP α de alta afinidad FD6, pero no SIRP α humano de alelo 1 de tipo silvestre, a las células de cáncer de colon de ratón CT26. B. La variante SIRP α de alta afinidad FD6-Fc bloquea la unión de los tetrámeros SIRP α de ratón de tipo silvestre al CD47 de ratón que se muestra en la superficie de la levadura. C. La variante SIRP α de alta afinidad CV1 se une al CD47 de ratón que se muestra en la superficie de la levadura. D. Unión de SIRP α alelo 2-Fc de tipo silvestre 100 nM, SIRP α -Fc de alta afinidad o anticuerpos anti-CD47 (clones B6H12 y 5F9) a células MDCK caninas, detectado por citometría de flujo con un anticuerpo secundario anti-IgG humano.

DEFINICIONES

25 En la descripción que sigue, se usan varios términos usados convencionalmente en el campo del cultivo celular. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y coherente de la especificación y las reivindicaciones, y el alcance que debe darse a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

30 Los términos y frases "inhibidores", "agentes de bloqueo" y "agentes de enmascaramiento" de la interacción entre SIRP α y su ligando CD47 se refieren a moléculas que evitan la unión de SIRP α y CD47. Para fines de desarrollo, la unión puede realizarse en condiciones experimentales, por ejemplo, usando proteínas aisladas como compañeros de unión, usando porciones de proteínas como compañeros de unión, usando la presentación de levadura de proteínas o porciones de proteínas como compañeros de unión y similares.

35 Para fines fisiológicamente relevantes, la unión de SIRP α y CD47 es habitualmente un evento entre dos células, donde cada célula expresa uno de los compañeros de unión. De particular interés es la expresión de SIRP α en células fagocíticas, tales como los macrófagos; y la expresión de CD47 en células que podrían ser dianas para la fagocitosis, por ejemplo, células tumorales, células hematopoyéticas circulantes, y similares. Los inhibidores pueden identificarse usando ensayos de unión *in vitro* e *in vivo* o señalización de receptor o ligando.

45 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos también se aplican a polímeros de aminoácidos en donde uno o más restos de aminoácido son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

50 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados mediante el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que la de un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Aminoácidos miméticos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural.

60 Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un mamífero que se está evaluando para el tratamiento y/o se está tratando. El mamífero puede ser un ser humano. Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" abarcan, sin limitación, individuos que tienen cáncer. Los sujetos pueden ser humanos, pero también incluyen otros mamíferos, particularmente aquellos mamíferos útiles como modelos de laboratorio para enfermedades humanas, por ejemplo, ratón, rata, etc.

65 Los términos "cáncer", "neoplasia" y "tumor" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a células que exhiben un crecimiento autónomo no regulado, de manera que presentan un fenotipo de crecimiento aberrante

- caracterizado por una pérdida significativa de control sobre la proliferación celular. Las células de interés para la detección, el análisis o el tratamiento en la presente solicitud incluyen células precancerosas (por ejemplo, benignas), malignas, pre-metastásicas, metastásicas y no metastásicas. Se conocen cánceres de prácticamente todos los tejidos. La frase "carga de cáncer" se refiere a la cantidad de células cancerosas o el volumen de cáncer en un sujeto. Por consiguiente, reducir la carga de cáncer se refiere a reducir la cantidad de células cancerosas o el volumen de cáncer en un sujeto. La frase "célula cancerosa", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula que es una célula cancerosa o deriva de una célula cancerosa, por ejemplo, un clon de una célula cancerosa. Los expertos en la materia conocen muchos tipos de cánceres, incluyendo tumores sólidos tales como carcinomas, sarcomas, glioblastomas, melanomas, linfomas, mielomas, etc. y cánceres circulantes tales como leucemias. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de cerebro.
- La "patología" del cáncer incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anormal o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de las células vecinas, liberación de citocinas u otros productos secretores a niveles anormales, supresión o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, neoplasia, pre-neoplasia maligna, neoplasia maligna, invasión de tejidos u órganos circundantes o distantes, tales como los ganglios linfáticos, etc.
- Como se usa en el presente documento, las frases "recurrencia del cáncer" y "recurrencia tumoral" y variantes gramaticales de las mismas, se refieren a un mayor crecimiento de células neoplásicas o cancerosas después del diagnóstico de cáncer. En particular, La recurrencia puede producirse cuando se produce un mayor crecimiento de células cancerosas en el tejido canceroso. La "propagación del tumor", de manera similar, se produce cuando las células de un tumor se diseminan en tejidos y órganos locales o distantes; por lo tanto, la propagación tumoral abarca la metástasis tumoral. La "invasión tumoral" se produce cuando el crecimiento tumoral se propaga localmente para comprometer la función de los tejidos implicados por compresión, destrucción o prevención de la función normal de los órganos.
- Como se usa en el presente documento, el término "metástasis" se refiere al crecimiento de un tumor canceroso en un órgano o parte del cuerpo, que no está directamente conectado al órgano del tumor canceroso original. Se entenderá que la metástasis incluye micrometástasis, que es la presencia de una cantidad indetectable de células cancerosas en un órgano o parte del cuerpo que no está directamente conectada al órgano del tumor canceroso original. La metástasis también puede definirse como varias etapas de un proceso, tales como la salida de las células cancerosas del sitio original del tumor y la migración y/o invasión de las células cancerosas a otras partes del cuerpo.
- El término "muestra" con respecto a un paciente abarca muestras de sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido tales como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de la misma y la progenie del mismo. La definición también incluye muestras que se han manipulado de alguna manera después de su adquisición, tales como mediante tratamiento con reactivos; lavado; o enriquecimiento para ciertas poblaciones celulares, tales como las células cancerosas. La definición también incluye muestras que se han enriquecido para tipos particulares de moléculas, por ejemplo, ácidos nucleicos, polipéptidos, etc. La frase "muestra biológica" abarca una muestra clínica y también incluye tejido obtenido mediante resección quirúrgica, tejido obtenido por biopsia, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, muestras de tejido, órganos, médula ósea, sangre, plasma, suero y similares. Una "muestra biológica" incluye una muestra obtenida de la célula cancerosa de un paciente, por ejemplo, una muestra que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos que se obtiene de la célula cancerosa de un paciente (por ejemplo, un lisado celular u otro extracto celular que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos); y una muestra que comprende células cancerosas de un paciente. Una muestra biológica que comprende una célula cancerosa de un paciente también puede incluir células no cancerosas.
- El término "diagnóstico" se usa en el presente documento para referirse a la identificación de un estado molecular o patológico, enfermedad o afección, tales como la identificación de un subtipo molecular de cáncer de mama, cáncer de próstata u otro tipo de cáncer.
- El término "pronóstico" se usa en el presente documento para referirse a la predicción de la probabilidad de muerte o progresión atribuible al cáncer, incluyendo recurrencia, propagación metastásica y resistencia a fármacos, de una enfermedad neoplásica, tales como cáncer de ovario. El término "predicción" se usa en el presente documento para referirse al acto de predecir o estimar, basándose en la observación, la experiencia o el razonamiento científico. En un ejemplo, un médico puede predecir la probabilidad de que un paciente sobreviva, después de la extirpación quirúrgica de un tumor primario y/o quimioterapia durante un cierto período de tiempo sin recurrencia del cáncer.
- Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" y similares, se refieren a administrar un agente o llevar a cabo un procedimiento, para los fines de obtener un efecto. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o un síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o síntomas de la enfermedad. El "tratamiento", como se usa en el presente documento, puede incluir el tratamiento de un tumor en un mamífero, particularmente en un ser

humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad o un síntoma de una enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero al que aún no se le haya diagnosticado que la tenga (por ejemplo, incluyendo enfermedades que pueden estar asociadas o provocadas por una enfermedad primaria; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad.

5 El tratamiento puede referirse a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora o prevención de un cáncer, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tales como moderación; remisión; disminución de los síntomas o hacer que la enfermedad o afección sea más tolerable para el paciente; ralentizar la tasa de degeneración o disminución; o hacer que el punto final de degeneración sea menos debilitante. El tratamiento o mejora de los síntomas
10 puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen realizado por un médico. En consecuencia, el término "tratar" incluye la administración de los compuestos o agentes de la presente divulgación para prevenir o retrasar, para aliviar o detener o inhibir el desarrollo de los síntomas o afecciones asociadas al cáncer u otras enfermedades. La frase "efecto terapéutico" se refiere a la reducción, eliminación o prevención de la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o los efectos secundarios de la enfermedad en el sujeto.

15 "En combinación con", "terapia de combinación" y "productos de combinación" se refieren a la administración concurrente a un paciente de un primer agente terapéutico y los compuestos como se usan en el presente documento. Cuando se administran en combinación, cada componente puede administrarse al mismo tiempo o de manera secuencial en cualquier orden en distintos momentos en el tiempo. Por lo tanto, cada componente puede administrarse
20 por separado pero lo suficientemente cerca en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

El tratamiento puede cumplirse administrando una combinación de un reactivo SIRP α de alta afinidad de la divulgación con un agente citotóxico. Una clase a modo de ejemplo de agentes citotóxicos son los agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, aldesleucina, altretamina,
25 amifostina, asparaginasa, bleomicina, capecitabina, carboplatino, carmustina, cladribina, cisaprida, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, docetaxel, doxorubicina, dronabinol, duocarmicina, etopósido, filgrastim, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, granisetron, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, interferón alfa, irinotecán, lansoprazol, levamisol, leucovorina, megestrol, mesna, metotrexato, metoclopramida, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, omeprazol, ondansetrón, paclitaxel (Taxol™), pilocarpina, procloroperazina,
30 rituximab, saproina, tamoxifeno, taxol, clorhidrato de topotecán, trastuzumab, vinblastina, vincristina y tartrato de vinorelbina.

La administración de un reactivo SIRP α de alta afinidad de la divulgación puede combinarse con una dosis eficaz de un agente que aumente el hematocrito del paciente, por ejemplo, agentes estimulantes de la eritropoyetina (ESA). Tales agentes son conocidos y se usan en la técnica, incluyendo, por ejemplo, Aranesp® (darbepoetina alfa),
35 Epogen®/Procrit® (epoetina alfa), Omontys® (peginesatida), Procrit®, etc.

Otras terapias de combinación incluyen la administración con anticuerpos específicos de células, por ejemplo anticuerpos selectivos para marcadores de células tumorales, radiación, cirugía y/o privación hormonal (Kwon *et al.*,
40 Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 96: 15074-9, 1999). Los inhibidores de la angiogénesis también pueden combinarse con los métodos de la divulgación.

En la actualidad varios anticuerpos están en uso clínico para el tratamiento del cáncer, y otros se encuentran en diferentes etapas de desarrollo clínico. Por ejemplo, existen varios antígenos y los correspondientes anticuerpos
45 monoclonales para el tratamiento de tumores malignos de células B. Un antígeno diana es CD20. El rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico no conjugado dirigido al antígeno CD20. CD20 tiene un papel funcional importante en la activación, proliferación y diferenciación de células B.

El antígeno CD52 está marcado como diana por el anticuerpo monoclonal alemtuzumab, que está indicado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica. CD22 se marca como diana por varios anticuerpos, y recientemente ha
50 demostrado eficacia combinada con toxina en la leucemia de células pilosas resistente a la quimioterapia. Dos nuevos anticuerpos monoclonales dirigidos a CD20, tosimumab e ibritumomab, se han enviados a la Food and Drug Administration (FDA). Estos anticuerpos están conjugados con radioisótopos. Alemtuzumab (Campath) se usa en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica; El gemtuzumab (Mylotarg) encuentra uso en el tratamiento de la leucemia mielógena aguda; Ibritumomab (Zevalin) encuentra uso en el tratamiento del linfoma no Hodgkiniano; Panitumumab
55 (Vectibix) encuentra uso en el tratamiento del cáncer de colon.

Los anticuerpos monoclonales útiles en los métodos de la divulgación que se han usado en tumores sólidos incluyen, sin limitación, edrecolomab y trastuzumab (herceptin). Edrecolomab se dirige al antígeno 17-1A que se ve en el cáncer
60 de colon y rectal y se ha aprobado para su uso en Europa para estas indicaciones. Trastuzumab se dirige al antígeno HER-2/neu. Este antígeno se observa en el 25 % al 35 % de los cánceres de mama. El cetuximab (Erbix) también es de interés para su uso en los métodos de la divulgación. El anticuerpo se une al receptor de EGF (EGFR) y se ha usado en el tratamiento de tumores sólidos que incluyen cáncer de colon y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN).

65 Además de las terapias contra el cáncer, los reactivos SIRP α de la divulgación son útiles en otras terapias en las que los anticuerpos monoclonales se administran con el fin de agotar las células, por ejemplo, en el tratamiento de

enfermedades inflamatorias por agotamiento de las células inmunitarias. Para tales fines, el reactivo SIRPa de la divulgación se administra en combinación con un anticuerpo terapéutico, por ejemplo, con rituximab para el agotamiento de las células B en enfermedades inflamatorias y afecciones autoinmunitarias; alemtuzumab para la esclerosis múltiple; OKT3 para inmunosupresión; otros para acondicionamiento de trasplante de médula ósea; y similares.

"Administración concomitante" de un fármaco terapéutico contra el cáncer, ESA o el anticuerpo dirigido contra el tumor con una composición farmacéutica de la presente divulgación significa la administración con el reactivo SIRPa de alta afinidad en tal momento que tanto el fármaco, ESA o anticuerpo y la composición de la presente divulgación tendrá un efecto terapéutico. Dicha administración concomitante puede implicar la administración concurrente (es decir, al mismo tiempo), previa o posterior del fármaco, ESA o anticuerpo con respecto a la administración de un compuesto de la divulgación. Una persona experta en la materia no tendría dificultades para determinar el momento, la secuencia y las dosificaciones apropiados de administración para fármacos y composiciones particulares de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, la frase "supervivencia libre de enfermedad", se refiere a la falta de dicha recurrencia y/o diseminación tumoral y al destino de un paciente después del diagnóstico, con respecto a los efectos del cáncer en la esperanza de vida del paciente. La frase "supervivencia general" se refiere al destino del paciente después del diagnóstico, a pesar de la posibilidad de que la causa de la muerte en un paciente no se deba directamente a los efectos del cáncer. Las frases, "probabilidad de supervivencia libre de enfermedad", "riesgo de recurrencia" y variantes de las mismas, se refieren a la probabilidad de recurrencia o diseminación tumoral en un paciente posterior al diagnóstico de cáncer, en donde la probabilidad se determina de acuerdo con el proceso de la divulgación.

Como se usa en el presente documento, la frase "se correlaciona", o "se correlaciona con" y términos similares, se refieren a una asociación estadística entre instancias de dos eventos, donde los eventos incluyen números, conjuntos de datos y similares. Por ejemplo, cuando los eventos implican números, una correlación positiva (también denominada en el presente documento una "correlación directa") significa que a medida que uno aumenta, el otro también aumenta. una correlación negativa (también denominada en el presente documento una "correlación inversa") significa que a medida que uno aumenta, el otro disminuye.

"Dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el individuo particular a tratar. Cada unidad puede contener una cantidad predeterminada de compuesto o compuestos activos calculada para producir el efecto o efectos terapéuticos deseados en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación puede dictarse por (a) las características únicas del compuesto o compuestos activos y el efecto o efectos terapéuticos particulares a lograr y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la formación de compuestos de tales compuesto o compuestos activos.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para su uso veterinario, así como para su uso farmacéutico humano. Tales excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en caso de una composición en aerosol, gaseosos.

"Sales y ésteres farmacéuticamente aceptables" significan sales y ésteres que son farmacéuticamente aceptables y tienen las propiedades farmacológicas deseadas. Dichas sales incluyen sales que pueden formarse donde los protones ácidos presentes en los compuestos son capaces de reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen aquellas formadas con los metales alcalinos, por ejemplo, sodio y potasio, magnesio, calcio y aluminio. Las sales orgánicas adecuadas incluyen aquellas formadas con bases orgánicas tales como bases de amina, por ejemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N metilglucamina y similares. Dichas sales también incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácidos clorhídrico y bromhídrico) y ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico y los ácidos alcano- y areno-sulfónicos tales como ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico). Los ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen ésteres formados a partir de grupos carboxi, sulfoniloxi y fosfonoxi presentes en los compuestos, por ejemplo, ésteres de alquilo C₁₋₆. Cuando hay dos grupos ácidos presentes, una sal o éster farmacéuticamente aceptable puede ser un monoácido-mono-sal o éster o una di-sal o éster; y de manera similar donde hay más de dos grupos ácidos presentes, algunos o todos de tales grupos pueden estar salificados o esterificados. Los compuestos nombrados en esta divulgación pueden estar presentes en forma no salificada o no esterificada, o en forma salificada y/o esterificada, y la denominación de tales compuestos está destinada a incluir tanto el compuesto original (no salificado y no esterificado) y sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables. También, ciertos compuestos nombrados en esta divulgación pueden estar presentes en más de una forma estereoisomérica, y la denominación de tales compuestos está destinada a incluir todos los estereoisómeros individuales y todas las mezclas (ya sean racémicas o no) de tales estereoisómeros.

Las expresiones "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y las variaciones gramaticales de las mismas, que se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales son capaces de administrarse a o sobre un ser humano sin la producción de efectos fisiológicos indeseables en un grado que prohibiría la administración de la composición.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para esa enfermedad.

5 Descripción detallada

Se proporcionan polipéptidos SIRP α de alta afinidad y análogos de los mismos, que pueden denominarse genéricamente como reactivos SIRP α de alta afinidad. Los reactivos son variantes de la proteína SIRP α humana nativa. La presente divulgación proporciona un polipéptido variante SIRP α soluble, en donde el polipéptido carece del dominio transmembrana de SIRP α y comprende al menos uno y no más de 15 cambios de aminoácidos en relación con la secuencia de SIRP α de tipo silvestre y en donde el cambio de aminoácido aumenta la afinidad de la unión del polipéptido SIRP α a CD47, por ejemplo, disminuyendo la tasa de descuento en al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o más.

De acuerdo con la presente divulgación, los cambios de aminoácidos incluyen cualquier modificación de aminoácidos producida naturalmente o por el hombre conocida o descubierta más tarde en el campo. Los cambios de aminoácidos pueden incluir, por ejemplo, sustitución, delección, adición, inserción, etc. de uno o más aminoácidos. Los cambios de aminoácidos pueden incluir reemplazar un aminoácido existente por otro aminoácido. Los cambios de aminoácidos pueden incluir reemplazar uno o más aminoácidos existentes por aminoácidos no naturales o insertar uno o más aminoácidos no naturales. Pueden hacerse cambios de aminoácidos en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más restos de aminoácidos en relación con una secuencia nativa. El uno o más cambios de aminoácidos alteran las propiedades de SIRP α , por ejemplo, afectando la estabilidad, la actividad de unión y/o la especificidad, etc.

El reactivo SIRP α de alta afinidad de la descripción comprende al menos una modificación de aminoácidos dentro del dominio d1 de SIRP α , cuyo dominio se establece en SEQ ID NO: 1 y corresponde a los restos 31 a 149 de la proteína humana de longitud completa humana nativa. El reactivo SIRP α de alta afinidad puede consistir en todo o una parte del dominio d1; y puede comprender además uno o más aminoácidos de SIRP α fuera del dominio d1; o puede comprender secuencias de aminoácidos distintas de SIRP α , que incluyen, sin limitación, secuencias de la región Fc de inmunoglobulina.

Los polipéptidos SIRP α de alta afinidad pueden tener al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 110, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, hasta la longitud total de la proteína de tipo silvestre en el dominio transmembrana, es decir, aproximadamente 343 aminoácidos de longitud, y opcionalmente se fusiona con un polipéptido heterólogo, por ejemplo, Fc inmunoglobulina.

Los péptidos más cortos dentro del dominio d1 y que comprenden al menos un cambio de aminoácido establecido en el presente documento encuentran uso, donde tales péptidos comprenden habitualmente un tramo contiguo de aminoácidos de una secuencia establecida en el presente documento de no más de 10 aminoácidos de longitud, no más de 15 aminoácidos de longitud, no más de 20, no más de 25, no más de 30 aminoácidos, no más de 35 aminoácidos, no más de 40 aminoácidos, no más de 45 aminoácidos, no más de 50 aminoácidos, no más de 55 aminoácidos, no más de 60 aminoácidos, no más de 65 aminoácidos, no más de 70 aminoácidos, no más de 75 aminoácidos, no más de 80 aminoácidos, no más de 85 aminoácidos, no más de 90 aminoácidos, no más de 95 aminoácidos, no más de 100 aminoácidos.

Los cambios de aminoácidos en el polipéptido SIRP α de alta afinidad se realizan en uno o más de los aminoácidos dentro del conjunto de restos del núcleo hidrófobo de SIRP α , que incluyen, sin limitación, los restos (numeración definida por la secuencia de tipo silvestre del dominio d1, expuesta como SEQ ID NO:1) L4, V6, V27, I36, F39, L48, I49, Y50, F57, V60, M72, F74, I76, V92, F94 y F103. Los cambios de aminoácidos pueden realizarse en la secuencia del alelo 2 de tipo silvestre, por ejemplo, como se muestra para CV1.

Pueden hacerse cambios de aminoácidos en uno o más de los aminoácidos dentro del conjunto de restos de contacto que interactúan con CD47, que incluyen, sin limitación, A29, L30, I31, P32, V33, G34, P35, Q52, K53, E54, S66, T67, K68, R69, F74, K93, K96, G97, S98 y D100 (SEQ ID NO:1).

Pueden hacerse cambios de aminoácidos a dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más y no más de 14 aminoácidos dentro del conjunto combinado de restos de contacto y el conjunto de restos centrales hidrófobos definidos anteriormente.

Los cambios de aminoácidos se realizan en uno o más de los aminoácidos dentro del conjunto que incluye, sin limitación, los restos L4, V6, A21, V27, I31, E47, K53, E54, H56, S66, V63, K68, V92, F94 y F103 o una combinación de los mismos, por ejemplo en dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más y no más de 15 restos.

El reactivo SIRP α de alta afinidad puede comprender al menos un cambio de aminoácido seleccionado de (1) L4V; L4I; (2) V6I; V6L; (3) A21V; (4) V27I; V27L; (5) I31T; I31S; I31F; (6) E47V; E47L; (7) K53R; (8) E54Q; (9) H56P; H56R;

(10) S66T; S66G; (11) K68R; (12) V92I; (13) F94L; F94V; (14) V63I; y (15) F103V. El polipéptido SIRP α de alta afinidad puede comprender modificaciones seleccionadas de (1) a (15) anteriores, en dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14 o todos los 15 de los restos; y combinaciones y equivalentes conservativos de los mismos.

5 Los conjuntos de cambios de aminoácidos pueden incluir combinaciones de los anteriores, por ejemplo:

- V27I o V27L; K53R; S66T o S66G; K68R; y F103V.
- L4V o L4I; V27I o V27L; E47V o E47L; K53R; E54Q; S66T o S66G; K68R; V92I; y F103V.
- L4V o L4I; V6I o V6L; A21V; V27I o V27L; I31T, I31S o I31F; E47V o E47L; K53R; H56P o H56R; S66T o S66G; K68R; y F94L o F94V.
- V6I o V6L; V27I o V27L; I31T, I31S o I31F; E47V o E47L; K53R; E54Q; H56P o H56R; S66T o S66G; V92I; y F94L o F94V.
- L4V o L4I; A21V; V27I o V27L; I31T, I31S o I31F; E47V o E47L; K53R; E54Q; H56P o H56R; S66T o S66G; F94L o F94V; y F103V.
- L4V o L4I; V6I o V6L; V27I o V27L; I31T, I31S o I31F; E47V o E47L; K53R; H56P o H56R; S66T o S66G; K68R; V92I; y F94L o F94V.
- L4V o L4I; V6I o V6L; I31T, I31S o I31F; E47V o E47L; K53R; H56P o H56R; S66T o S66G; V92I; y F103V.
- V6I; V27I; I31F; E47L; K53R; E54Q; H56P; y S66T.
- L4V; V6I; V27I; I31F; E47V; K53R; E54Q; H56P; V63I; S66T; K68R; y V92I.
- V6I; V27I; I31T; E47V; K53R; E54Q; H56P; S66G; K68R; V92I; y F103V.
- V6I; V27I; I31F; E47V; K53R; E54Q; H56P; S66T; y V92I.

El polipéptido SIRP α de alta afinidad puede comprender el conjunto de cambios de aminoácidos:

- {V27I; K53R; S66T; S66G; K68R; F103V} por ejemplo como se muestra en (SEQ ID NO:3);
- {L4V; V27L; E47V; K53R; E54Q; S66G; K68R; V92I} por ejemplo como se muestra en (SEQ ID NO:4);
- {L4V; V6I; A21V; V27I; I31T; E47L; K53R; H56P; S66T; K68R; F94L} por ejemplo como se muestra en (SEQ ID NO:5);
- {V6I; V27I; I31S; I31F; E47V; K53R; E54Q; H56P; S66G; V92I; F94L} por ejemplo como se muestra en (SEQ ID NO:6);
- {L4I; A21V; V27I; I31F; E47V; K53R; E54Q; H56R; S66G; F94V; F103V} por ejemplo como se muestra en (SEQ ID NO:7);
- {L4V; V6I; V27I; I31F; E47V; K53R; H56R; S66G; K68R; V92I; F94L} por ejemplo como se muestra en (SEQ ID NO:8); o
- {L4V; V6L; I31F; E47V; K53R; H56P; S66G; V92I; F103V} por ejemplo como se muestra en (SEQ ID NO:9)
- {V6I; V27I; I31F; E47L; K53R; E54Q; H56P; S66T} por ejemplo como se muestra en SEQ ID NO: 37.
- {L4V; V6I; V27I; I31F; E47V; K53R; E54Q; H56P; V63I; S66T; K68R; V92I} por ejemplo como se muestra en SEQ ID NO:38.
- {V6I; V27I; I31T; E47V; K53R; E54Q; H56P; S66G; K68R; V92I; F103V} por ejemplo como se muestra en SEQ ID NO:39.
- {V6I; V27I; I31F; E47V; K53R; E54Q; H56P; S66T; V92I} por ejemplo como se muestra en SEQ ID NO:10.

Para los fines de la divulgación, un reactivo de la divulgación comprende la porción de SIRP α que es suficiente para unir CD47 en una afinidad reconocible, por ejemplo, alta afinidad, que normalmente se encuentra entre la secuencia señal y el dominio transmembrana, o un fragmento de la misma que retiene la actividad de unión. El reactivo SIRP α de alta afinidad generalmente comprenderá al menos el dominio d1 de SIRP α (SEQ ID NO:1) con restos de aminoácidos modificados como se describe anteriormente. El polipéptido SIRP α de alta afinidad puede comprender al menos los aminoácidos 1-3, 7-20, 32-46, 69-91, 95-102 de un polipéptido SIRP α d1 de tipo silvestre (SEQ ID NO:1) o una variante alélica del mismo, es decir, alelo 2 de tipo silvestre. El polipéptido SIRP α de alta afinidad puede comprender además porciones de la proteína SIRP α humana nativa además del dominio d1, incluyendo sin limitación los restos 150 a 374 de la proteína nativa (establecida como SEQ ID NO:2) o incluyendo, sin limitación, al menos 10 aminoácidos contiguos de la secuencia establecida en SEQ ID NO:2, al menos 20 aminoácidos contiguos, al menos 50 aminoácidos contiguos, al menos 100 aminoácidos contiguos, al menos 125 aminoácidos contiguos, al menos 250 aminoácidos contiguos o más.

Los reactivos SIRP α de alta afinidad de la presente divulgación pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, uniéndose a una amplia diversidad de otros oligopéptidos o proteínas para diversos fines. Por ejemplo, modificarse post-traduccionalmente, por ejemplo por prenilación, acetilación, amidación, carboxilación, glucosilación, pegilación, etc. Dichas modificaciones también pueden incluir modificaciones de glucosilación, por ejemplo, aquellas realizadas mediante la modificación de los patrones de glucosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; por ejemplo, mediante la exposición del polipéptido a enzimas que afectan a la glucosilación, tales como enzimas glucosilantes o desglucosilantes de mamífero. Las variantes de SIRP α de la presente descripción incluyen variantes de SIRP α que tienen restos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

El reactivo SIRP α de alta afinidad puede tener una K_D cinética de al menos aproximadamente 1×10^{-8} M para CD47.

El reactivo SIRP α de alta afinidad puede tener una K_D cinética de al menos aproximadamente 1×10^{-9} M para CD47. El reactivo SIRP α de alta afinidad puede tener una K_D cinética de al menos aproximadamente 1×10^{-10} M para CD47. El reactivo SIRP α de alta afinidad puede exhibir una K_D cinética a CD47 que es al menos aproximadamente 5 veces mayor que la K_D cinética del polipéptido SIRP α humano nativo, ejemplificado en SEQ ID NO:1 y 2. El reactivo SIRP α de alta afinidad tiene una K_D cinética a CD47 que es al menos aproximadamente 10 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces mayor que la K_D cinética del polipéptido SIRP α nativo.

La unión a CD47 puede determinarse, por ejemplo, por la capacidad del reactivo SIRP α para unirse a CD47 recubierto sobre una placa de ensayo; exhibido en una superficie celular microbiana; en solución; *etc.* La actividad de unión de las variantes de SIRP α de la presente divulgación a CD47 puede ensayarse inmovilizando el ligando, por ejemplo, CD47 o la variante SIRP α , en una perla, sustrato, célula, *etc.* Los agentes pueden añadirse en un tampón apropiado y los compañeros de unión se incuban durante un período de tiempo a una temperatura dada. Después de los lavados para retirar el material no unido, la proteína unida puede liberarse con, por ejemplo, SDS, tampones con un pH alto y similares y analizarse.

Una variante SIRP α de la presente divulgación puede ser una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada en marco con un segundo polipéptido. El segundo polipéptido puede ser capaz de aumentar el tamaño de la proteína de fusión, por ejemplo, para que la proteína de fusión no se elimine de la circulación rápidamente. El segundo polipéptido puede ser parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina. De manera alternativa, el segundo polipéptido puede ser cualquier polipéptido adecuado que sea sustancialmente similar a Fc, por ejemplo, proporcionando mayor tamaño, dominios de multimerización y/o unión o interacción adicional con moléculas de Ig. Estas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación, multimerización y muestran una semivida *in vivo* aumentada. Las proteínas de fusión que tienen estructuras multiméricas enlazadas por disulfuro también pueden ser más eficientes en la unión y neutralización de otras moléculas que un SIRP α monomérico.

El dominio de unión de SIRP α de alta afinidad, es decir, un dominio SIRP α d1 modificado como se establece en el presente documento para proporcionar una unión de alta afinidad a CD47, puede proporcionarse como una proteína multimérica, es decir, dos, tres, cuatro o más dominios de unión a SIRP α están unidos covalentemente o no covalentemente, por ejemplo, como una proteína de fusión; por uniones disulfuro; a través de la unión de biotina a avidina, estreptavidina, *etc.* Dichas proteínas de unión a SIRP α multiméricas de alta afinidad son útiles como agentes únicos para aumentar la fagocitosis de las células que expresan CD47; o en combinación con otros agentes de unión, por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de células.

El dominio de unión a SIRP α de alta afinidad puede fusionarse o unirse de otra manera a una secuencia de inmunoglobulina para formar una proteína quimérica. La secuencia de inmunoglobulina preferentemente, pero no necesariamente, es el dominio o dominios constantes de inmunoglobulina. La fracción de inmunoglobulina en tales quimeras puede obtenerse de cualquier especie, habitualmente el ser humano, e incluye los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD o IgM. La fracción de inmunoglobulina puede comprender uno o más dominios, por ejemplo CH1, CH2, CH3, *etc.*

Las quimeras construidas a partir de una secuencia enlazada a una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina apropiada se conocen en la técnica. En tales fusiones, el polipéptido quimérico codificado puede retener al menos una bisagra funcionalmente activa, dominios CH2 y CH3 de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones también se hacen al extremo C-terminal de la porción Fc de un dominio constante, o inmediatamente N-terminal al CH1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera. El sitio preciso en el que se realiza la fusión no es crítico; los sitios particulares son bien conocidos y pueden seleccionarse para optimizar la actividad biológica, las características de secreción o de unión de las quimeras de polipéptido SIRP α -inmunoglobulina. Las quimeras de polipéptido SIRP α -inmunoglobulina pueden ensamblarse como monómeros o hetero- u homo-multímeros, y particularmente como dímeros o tetrámeros.

Aunque no se requiere la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina, puede incluirse una cadena ligera de inmunoglobulina, ya sea asociada covalentemente a un polipéptido de fusión de polipéptido SIRP α -cadena pesada de inmunoglobulina, como directamente fusionado al polipéptido SIRP α . Puede usarse una construcción de cadena única para proporcionar regiones constantes de cadena pesada y ligera.

En otras construcciones de proteínas de fusión, el segundo polipéptido es una secuencia marcadora, tal como un péptido que facilita la purificación del polipéptido fusionado. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del marcador puede ser un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Como se describe en Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824, 1989, por ejemplo, la hexa-histidina permite la purificación conveniente de la proteína de fusión. Otra etiqueta peptídica útil para la purificación, la etiqueta "HA", corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe. Wilson *et al.*, Cell 37: 767, 1984. La adición de fracciones peptídicas para facilitar el manejo de polipéptidos son técnicas familiares y rutinarias en la técnica.

El dominio de unión a SIRP α de alta afinidad puede proporcionarse como una proteína monomérica, que puede ser un dominio d1 aislado, o un dominio d1 fusionado a SIRP α o secuencias quiméricas. Los dominios de unión a SIRP α

monoméricos son útiles, por ejemplo, como un adyuvante para aumentar la fagocitosis de las células que expresan CD47, cuando se combina con un agente de unión específico de células, por ejemplo, un anticuerpo, particularmente un anticuerpo específico de células tumorales como se define en el presente documento. Los dominios de unión a SIRP α monoméricos también son útiles como adyuvantes para aumentar la fagocitosis, así como otras funciones inmunitarias, por ejemplo, ADCC, captación de antígenos para la presentación de antígenos, y similares por parte de varias células inmunitarias, tales como los macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, granulocitos y similares, que expresan SIRP α y responden al bloqueo con los reactivos SIRP α de la divulgación. Los dominios de unión a SIRP α de alta afinidad monoméricos también son útiles como agentes de formación de imagen, por ejemplo, cuando se conjuga con un marcador detectable.

Los reactivos SIRP α de alta afinidad de la descripción incluyen reactivos modificados adicionalmente para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacerlos más adecuados como agente terapéutico. Por ejemplo, las variantes de la presente descripción incluyen además análogos que contienen restos distintos de los L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos que no son de origen natural. Los D-aminoácidos pueden sustituirse por algunos o todos los restos de aminoácidos.

El reactivo SIRP α de alta afinidad puede acoplarse o conjugarse con uno o más restos de formación de imagen, es decir, un marcador detectable. Como se usa en el presente documento, "fracción citotóxica" se refiere a una fracción que inhibe el crecimiento celular o promueve la muerte celular cuando está cerca de o se absorbe por la célula. Las fracciones citotóxicas adecuadas con respecto a esto incluyen isótopos radiactivos (radionúclidos), agentes quimiotóxicos tales como inductores de diferenciación y fármacos quimiotóxicos pequeños, proteínas de toxinas y derivados de las mismas.

Como se utiliza en el presente documento, "fracción de formación de imagen" o marcador detectable, se refiere a una fracción que puede utilizarse para aumentar el contraste entre un tumor y el tejido sano circundante en una técnica de visualización, por ejemplo, radiografía, tomografía de emisión de positrones, obtención de imágenes por resonancia magnética, inspección visual directa o indirecta. Por lo tanto, las fracciones de formación de imagen adecuadas incluyen restos de radiografía, por ejemplo, fracciones de metales pesados y emisoras de radiación, fracciones emisoras de positrones, radicales de contraste de resonancia magnética y radicales ópticamente visibles (por ejemplo, tintes fluorescentes o de espectro visible, partículas visibles, etc. Un experto en la materia apreciará que existe cierta superposición entre lo que es una fracción terapéutica y lo que es una fracción de formación de imágenes.

En general, los agentes terapéuticos o de formación de imagen pueden conjugarse con la fracción de reactivo SIRP α de alta afinidad mediante cualquier técnica adecuada, con la consideración adecuada de la necesidad de estabilidad farmacocinética y una toxicidad global reducida para el paciente. Una reacción directa entre un agente y SIRP α es posible cuando cada uno posee un grupo funcional capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleofílico, tales como un grupo amino o sulfhidrilo, puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tales como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro). De manera alternativa, puede usarse un grupo enlazador químico adecuado. Un grupo enlazador puede funcionar como un espaciador para evitar interferencias con las capacidades de unión.

Será evidente para los expertos en la materia que diversos reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homo- como hetero-funcionales (tales como aquellos descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.), puede emplearse como un grupo enlazador. El acoplamiento puede efectuarse, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o restos de carbohidratos oxidados. Existen numerosas referencias que describen dicha metodología. Alternativamente, el SIRP α se une a la fracción citotóxica o de formación de imagen mediante el uso de un par de unión no covalente, tales como estreptavidina/biotina o avidina/biotina. En estos casos, un miembro del par está acoplado covalentemente a SIRP α y el otro miembro del par de unión está acoplado covalentemente a la fracción citotóxica o de formación de imágenes. Puede ser deseable acoplar más de un resto citotóxico y/o de formación de imágenes. Al poli-derivatizar el reactivo SIRP α de alta afinidad, pueden implementarse varias estrategias simultáneamente, un anticuerpo puede hacerse útil como agente de contraste para varias técnicas de visualización, o un anticuerpo terapéutico puede marcarse para seguimiento mediante una técnica de visualización.

Un vehículo puede llevar a los agentes de varias maneras, incluyendo enlaces covalentes ya sea directamente o por medio de un grupo enlazador, y asociaciones no covalentes. Los vehículos de unión covalente adecuados incluyen proteínas tales como albúminas, péptidos y polisacáridos tales como aminodextrano, cada uno de los cuales tiene múltiples sitios para la fijación de fracciones. Un transportista también puede portar un agente por asociaciones no covalentes, tales como enlaces no covalentes o por encapsulación.

Los vehículos y enlazadores específicos para agentes radionúclidos incluyen moléculas pequeñas radiohalogenadas y compuestos quelantes. Puede formarse un quelato de radionúclidos a partir de compuestos quelantes que incluyen aquellos que contienen átomos de nitrógeno y azufre como los átomos donadores para unir el radionúclido de metal u óxido de metal.

Las fracciones radiográficas para su uso como restos de formación de imágenes en la presente divulgación incluyen

compuestos y quelatos con átomos relativamente grandes, tales como oro, iridio, tecnecio, bario, talio, yodo y sus isótopos. Se prefiere que las fracciones de formación de imagen radiográfica menos tóxicos, tales como yodo o isótopos de yodo, se utilicen en las composiciones y métodos de la divulgación. Tales restos pueden conjugarse con el resto de anticuerpo reactivo SIRPα de alta afinidad a través de un enlazador químico o vehículo de quelación aceptable. Los restos que emiten positrones para usar en la presente divulgación incluyen ¹⁸F, que puede conjugarse fácilmente mediante una reacción de fluoración con el reactivo SIRPα de alta afinidad.

Los restos de contraste de resonancia magnética incluyen quelatos de cromo (III), manganeso (II), hierro (II), níquel (II), cobre (II), praseodimio (III), neodimio (III), samario (III) e iones de iterbio (III). Debido a su muy fuerte momento magnético, se prefieren especialmente los iones gadolinio (III), terbio (III), disprosio (III), holmio (III), erbio (III) y hierro (III).

Los restos ópticamente visibles para su uso como restos de formación de imágenes incluyen colorantes fluorescentes o colorantes de espectro visible, partículas visibles y otros restos de marcaje visibles. Los colorantes fluorescentes tales como fluoresceína, cumarina, rodamina, bodipy rojo de Texas y tintes de cianina, son útiles cuando puede proporcionarse suficiente energía de excitación al sitio para inspeccionarse visualmente. Los procedimientos de visualización endoscópica pueden ser más compatibles con el uso de tales etiquetas. Los tintes aceptables incluyen tintes y colores para alimentos aprobados por la FDA, que no son tóxicos, aunque se prefieren los colorantes farmacéuticamente aceptables que se han aprobado para administración interna.

La cantidad eficaz de una composición conjugada de imagen para administrar a un paciente en particular dependerá de diversos factores, que serán varios de ellos diferentes de un paciente a otro. Un médico competente podrá determinar una cantidad eficaz para facilitar la visualización de un tumor. La dosificación dependerá del tratamiento del tumor, la vía de administración, la naturaleza de la terapéutica, la sensibilidad del tumor a la terapéutica, etc. Utilizando las habilidades habituales, el médico competente será capaz de optimizar la dosificación de una composición terapéutica o de imágenes particular durante el transcurso de ensayos clínicos rutinarios.

Una dosis típica puede ser de 0,001 a 100 miligramos de conjugado por kilogramo de peso corporal del sujeto. Las dosis relativamente grandes, en el intervalo de 0,1 a 10 mg por kilogramo de peso corporal del paciente puede usarse para formar imágenes de conjugados con una fracción de imágenes relativamente no tóxico. La cantidad utilizada dependerá de la sensibilidad del método de imagen y de la toxicidad relativa de la fracción de formación de imagen.

Las variantes de SIRPα de la presente descripción pueden producirse por cualquier medio adecuado conocido o descubierto posteriormente en el campo, por ejemplo, producido a partir de células eucariotas o procariotas, sintetizado *in vitro*, etc. Cuando la proteína se produce por las células procariotas, puede procesarse adicionalmente por desplegamiento, por ejemplo, por desnaturalización térmica, reducción de DTT, etc. y puede volverse a plegar adicionalmente, usando métodos conocidos en la técnica.

Los polipéptidos pueden prepararse mediante sistemas de traducción sin células o síntesis *in vitro* sintéticos, usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Diversos aparatos sintéticos comerciales están disponibles, por ejemplo, sintetizadores automatizados por Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, Beckman, etc. Mediante el uso de sintetizadores, los aminoácidos de origen natural pueden sustituirse por aminoácidos no naturales. La secuencia particular y la forma de preparación se determinarán por conveniencia, economía, pureza requerida y similares.

Los polipéptidos pueden aislarse y purificarse también de acuerdo con métodos convencionales de síntesis recombinante. Puede prepararse un lisado del hospedador de expresión y el lisado purificado usando HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad u otras técnicas de purificación. En su mayoría, las composiciones que se usan comprenderán al menos el 20 % en peso del producto deseado, más normalmente al menos aproximadamente el 75 % en peso, preferentemente al menos aproximadamente el 95 % en peso y, para fines terapéuticos, normalmente al menos aproximadamente el 99,5 % en peso, en relación con los contaminantes relacionados con el método de preparación del producto y su purificación. Habitualmente, los porcentajes se basarán en la proteína total.

Pueden usarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes del anticuerpo y las señales de control de la transcripción/traducción adecuadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. De manera alternativa, El ARN capaz de codificar los polipéptidos de interés puede sintetizarse químicamente. Un experto en la materia puede utilizar fácilmente tablas de uso de codones bien conocidas y métodos sintéticos para proporcionar una secuencia de codificación adecuada para cualquiera de los polipéptidos de la divulgación, Los ácidos nucleicos pueden aislarse y obtenerse con una pureza sustancial. Habitualmente, los ácidos nucleicos, ya sea como ADN o ARN, se obtendrán sustancialmente libres de otras secuencias de ácido nucleico de origen natural, generalmente siendo al menos aproximadamente el 50 %, habitualmente al menos aproximadamente el 90 % de pureza y son normalmente "recombinantes" por ejemplo, flanqueado por uno o más nucleótidos con los que normalmente no está asociado en un cromosoma natural. Los ácidos nucleicos de la descripción pueden proporcionarse como una molécula lineal o dentro de una molécula circular y pueden proporcionarse dentro de moléculas (vectores) que se replican de forma autónoma o dentro de moléculas

sin secuencias de replicación. La expresión de los ácidos nucleicos puede regularse por sí mismos o por otras secuencias reguladoras conocidas en la técnica. Los ácidos nucleicos de la descripción pueden introducirse en células hospedadoras adecuadas usando diversas técnicas disponibles en la técnica.

5 De acuerdo con la presente divulgación, Las variantes de SIRP α pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso terapéutico, por ejemplo, para tratamiento humano. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen una o más entidades terapéuticas de la presente divulgación o sales farmacéuticamente aceptables, ésteres o solvatos de los mismos. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen una o más entidades terapéuticas de la presente divulgación en combinación con otro agente terapéutico, por ejemplo, otro agente antitumoral.

15 Las entidades terapéuticas de la presente descripción a menudo se administran como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo y otro excipiente farmacéuticamente aceptable. La forma preferida depende del modo previsto de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, farmacéuticamente aceptable portadores o diluyentes no tóxicos, que se definen como vehículos comúnmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración a animales o seres humanos. El diluyente se selecciona para que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Algunos ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición farmacéutica o formulación puede incluir también otros vehículos, adyuvantes, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción también pueden incluir grandes moléculas, de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglucólicos y copolímeros (tales como Sepharose™ funcionalizado con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas).

MÉTODOS DE USO

30 Se proporcionan métodos para tratar, reducir o prevenir el cáncer, incluyendo sin limitación linfomas, leucemias, carcinomas, melanomas, glioblastomas, sarcomas, mielomas, *etc.* como cánceres primarios o metastásicos, inhibiendo la interacción entre SIRP α y CD47, aumentando de esta manera la fagocitosis *in vivo* de las células tumorales. Dichos métodos incluyen administrar a un sujeto que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis eficaz de un reactivo SIRP α de alta afinidad de la divulgación, incluyendo sin limitación combinaciones del reactivo con un fármaco quimioterapéutico, un anticuerpo específico de tumor o un ESA.

35 Las dosis eficaces de la entidad terapéutica de la presente divulgación, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero los mamíferos no humanos también pueden tratarse, por ejemplo, animales de compañía tales como perros, gatos, caballos, *etc.*, mamíferos de laboratorio tales como conejos, ratones, ratas, *etc.* y similares. Las dosis de tratamiento pueden ajustarse para optimizar la seguridad y la efectividad.

45 La dosificación terapéutica puede variar de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento a modo de ejemplo implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Las entidades terapéuticas de la presente divulgación generalmente se administran en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser semanal, mensual o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos de la entidad terapéutica en el paciente. De manera alternativa, Las entidades terapéuticas de la presente descripción pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia pueden variar dependiendo de la semivida del polipéptido en el paciente.

55 En aplicaciones profilácticas, puede administrarse una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento el resto de sus vidas. En otras aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca o termine, y hasta que el paciente muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. En lo sucesivo, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

65 Los métodos de la presente divulgación incluyen tratar, reducir o prevenir el crecimiento tumoral, metástasis tumoral o invasión tumoral de cánceres incluyendo linfomas, leucemias, carcinomas, melanomas, glioblastomas, sarcomas, mielomas, *etc.* Para aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible de, o de otro modo en riesgo de enfermedad, en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos,

histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad.

5 Pueden usarse los polipéptidos SIRP α de alta afinidad de la descripción *in vitro* e *in vivo* para monitorizar el transcurso de la terapia de la enfermedad, por ejemplo, midiendo el aumento o la disminución en el número de células que expresan CD47, particularmente células cancerosas que expresan CD47, puede determinarse si un régimen terapéutico particular dirigido a mejorar la enfermedad es eficaz. Para tales fines, el polipéptido SIRP α puede marcarse de forma detectable.

10 Pueden usarse los polipéptidos SIRP α de alta afinidad de la divulgación *in vitro* en ensayos de unión en los que pueden utilizarse en fase líquida o unirse a un vehículo en fase sólida. Además, los polipéptidos en estos inmunoensayos pueden marcarse de manera detectable de diversas maneras. Algunos ejemplos de tipos de ensayos que pueden utilizar polipéptidos SIRP α de alta afinidad de la divulgación son citometría de flujo, por ejemplo, FACS, MACS, histoquímica, inmunoensayos competitivos y no competitivos en formato directo o indirecto; y similares. La detección de CD47 usando los polipéptidos SIRP α de alta afinidad puede hacerse con ensayos que se ejecutan en modos
15 directo, inverso o simultáneo, incluyendo ensayos histoquímicos en muestras fisiológicas. Los expertos en la materia sabrán, o pueden discernir fácilmente, otros formatos de ensayo sin experimentación excesiva.

20 Los polipéptidos SIRP α de alta afinidad pueden unirse a muchos vehículos diferentes y usarse para detectar la presencia de células que expresan CD47. Algunos ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la divulgación, Aquellos expertos en la materia conocerán otros vehículos y formas de dosificación adecuados, o serán capaces de determinarlos, usando experimentación de rutina.

25 Hay muchos marcadores y métodos de marcaje diferentes conocidos por los expertos en la materia. Algunos ejemplos de los tipos de marcadores que pueden usarse en la presente descripción incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Los expertos en la materia conocerán otros marcadores adecuados para la unión a los polipéptidos de la divulgación o serán capaces de determinarlos, usando experimentación de rutina. Adicionalmente, la unión de estos marcadores a los polipéptidos de la divulgación puede hacerse usando técnicas convencionales comunes a los expertos en la materia.

30 CD47 puede detectarse por los polipéptidos SIRP α de alta afinidad de la descripción cuando está presente en fluidos y tejidos biológicos. Puede usarse cualquier muestra que contenga una cantidad detectable de CD47. Una muestra puede ser un líquido tales como orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, sangre, suero y similares, o un sólido o semisólido tales como tejidos, heces y similares o, de manera alternativa, un tejido sólido como los comúnmente utilizados en el diagnóstico histológico.

40 Otra técnica de marcaje que puede dar como resultado una mayor sensibilidad consiste en acoplar los polipéptidos a haptenos de bajo peso molecular. Estos haptenos pueden detectarse específicamente por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, es común usar haptenos tales como biotina, que reacciona con avidina o dinitrofenol, piridoxal o fluoresceína, que puede reaccionar con anticuerpos anti-hapteno específicos.

45 Los conjugados de imagen de un reactivo SIRP α de alta afinidad pueden administrarse al sujeto en una serie de más de una administración. Las composiciones conjugadas de formación de imágenes pueden administrarse en un momento apropiado antes de la técnica de visualización. Por ejemplo, la administración dentro de una hora antes de la inspección visual directa puede ser apropiada, o la administración dentro de las doce horas antes de que una exploración por MRI pueda ser apropiada. Debe tenerse cuidado, sin embargo, en no dejar pasar demasiado tiempo
50 entre la administración y la visualización, ya que el compuesto de formación de imagen puede finalmente eliminarse del sistema del paciente.

Las composiciones para el tratamiento del cáncer pueden administrarse por vía parenteral, tópica, intravenosa, intratumoral, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intraperitoneal, por medios intranasales o intramusculares.
55 Una ruta típica de administración es intravenosa o intratumoral, aunque otras rutas pueden ser igualmente eficaces.

Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, ya sea en forma de soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas
60 tales como polilactida, poliglicólido o copolímero para un efecto adyuvante mejorado, como se ha analizado anteriormente. Langer, Science 249: 1527, 1990 y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. Los agentes de esta divulgación pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o una preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsátil del principio activo. Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente como estériles, sustancialmente isotónicas y en total cumplimiento con todas las regulaciones de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) de la Administración de Fármacos
65 y Alimentos de Estados Unidos.

La toxicidad de los reactivos SIRP α de alta afinidad descritos en este documento puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) o la DL₁₀₀ (la dosis letal para el 100 % de la población).

5 La relación de dosis entre el efecto tóxicos y terapéutico es el índice terapéutico. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación que no es tóxico para su uso en seres humanos. La dosificación de las proteínas descritas en el presente documento se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la dosis eficaz con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden elegirse por el médico individual a la vista del estado del paciente.

También dentro del alcance de la divulgación están los kits que comprenden las composiciones (por ejemplo, reactivos SIRP α de alta afinidad y formulaciones de los mismos) de la divulgación y las instrucciones de uso. El kit puede 15 contener además al menos un reactivo adicional, por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico, anticuerpo antitumoral, ESA, etc. Los kits incluyen normalmente un marcador que indica el uso pretendido del contenido del kit. El término marcador incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que de otro modo acompaña al kit.

20 PARTE EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos habituales en la materia una divulgación y descripción completa de cómo producir y usar la presente invención y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención y tampoco pretenden representar que los experimentos a continuación sean todos 25 o los únicos experimentos llevados a cabo. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

30 **Expresión y purificación de proteínas:** El dominio IgSF de CD47 humano (restos 19-135) y las variantes del primer dominio IgSF de SIRP α humano (restos 31-148) se clonaron en pAcGP67 con etiquetas 8xHistidina C-terminales y se expresaron en células Hi5 usando baculovirus recombinante. La cisteína libre en el dominio CD47 IgSF se mutó a glicina. Las proteínas se purificaron por cromatografía Ni-NTA y filtración en gel sobre una columna Superdex-75 en HBS (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM). Para producir proteínas biotinizadas, se añadió una etiqueta de péptido 35 aceptor de biotina C-terminal (BAP)-LNDIFEAQKIEWHE y las proteínas se coexpresaron con ligasa BirA con exceso de biotina (100 μ M). Para la cristalización, la variante SIRP α FD6 se expresó en el periplasma de *E. coli* con una etiqueta de proteína de unión a maltosa N-terminal (MBP), que se retiró mediante tratamiento con proteasa 3C. El dominio CD47 IgSF se co-expresó con EndoF en células Hi5 en presencia de kifunensina para retirar la glucosilación.

40 Para la expresión de proteínas variantes de SIRP α como fusiones a las cadenas IgG4 y IgG2 Fc humanas, las variantes de SIRP α se clonaron en vectores pFUSE-hlgG4-Fc2 y pFUSE-hlgG2-Fc2 (Invivogen) en marco con la secuencia señal de IL2. Las proteínas de fusión variantes SIRP α se expresaron en células Freestyle 293-F (Invitrogen) después de la transfección con 293fectin (Invitrogen). Los sobrenadantes se cosecharon después de 96 horas de expresión de 45 proteínas y se purificaron sobre columnas de proteína A HiTrap (GE Healthcare).

50 **Cristalización y determinación estructural del complejo FD6:CD47:** FD6 derivado de *E. coli* y CD47 desglucosilado, derivado de insectos se mezclaron en una proporción 1:1 y se trataron con carboxipeptidasa A y B, seguido de filtración en gel sobre una columna Superdex-75 en HBS. El complejo se concentró a 22 mg/ml y se cristalizó por difusión de vapor en gotas sentadas mediante la adición de 0,1 μ l de proteína a un volumen igual de sulfato de amonio 2,0 M, Tris 0,1 M pH 7,3. Los estudios de difracción se realizaron en la fuente de luz avanzada. Las estructuras cristalinas se resolvieron mediante reemplazo molecular con PHASER y se refinaron usando PHENIX y COOT.

55 **Resonancia del plasmón superficial:** Los experimentos SPR se llevaron a cabo en un instrumento Biacore T100 a 25 °C. Los experimentos utilizaron un chip sensor Biacore SA (GE Healthcare) para capturar CD47 biotilado a una densidad superficial de aproximadamente 150 UR. Una proteína biotilada no relacionada se inmovilizó como una superficie de referencia para el chip sensor SA con UR correspondiente a la superficie experimental. Se hicieron flujir diluciones en serie de variantes de SIRP α no biotinizadas en el tampón en ejecución [1xHBS-P (GE Healthcare)] sobre 60 el chip a una velocidad de 50 μ l/min. El CD47 se regeneró usando tres inyecciones de 30 segundos de MgCl₂ 2 M. Los datos se analizaron utilizando el software de evaluación Biacore T100 versión 2.0 con un modelo de unión Langmuir 1:1.

65 **Líneas celulares de cáncer y condiciones de cultivo:** Las células Jurkat (ATCC) y las células DLD-1 (ATCC) se mantuvieron en RPMI (Invitrogen) + 10 % de suero bovino fetal (Omega Scientific) + 1 % de solución GlutaMax (Invitrogen) + 1 % de penicilina/estreptomina (Invitrogen). Las células Jurkat se mantuvieron en suspensión, mientras

que las células DLD-1 se mantuvieron como monocapas adherentes. Ambas líneas celulares se pasaron a intervalos regulares de 3-4 días antes de alcanzar la confluencia. Para hacer líneas celulares GFP-luciferasa+, las células Jurkat y DLD-1 se transdujeron con un lentivirus que expresa luciferasa2 (Promega)-eGFP derivado del vector lentivírico basado en VIH pCDH-CMV-MCS-EF1-puro (Systems Bioscience). Las células se clasificaron para células GFP+ usando un citómetro de flujo BD FACSAria II y se mantuvieron en cultivo de la misma manera que las líneas parentales.

Evaluación de unión de variantes SIRP α a células cancerosas humanas: Las células GFP+ Jurkat se lavaron en PBS y después se incubaron con concentraciones de titulación de variantes de SIRP α biotiniladas durante 30 minutos en hielo. El tetrámero SIRP α de tipo silvestre se formó previamente incubando una relación molar 4:1 de SIRP α de tipo silvestre biotinilado con estreptavidina durante 15 minutos en hielo. Las células se lavaron en tampón FACS (PBS + 2 % FBS), después se incubó con estreptavidina 50 nM conjugada con Alexa Fluor 647 durante 20 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces y después se analizaron para determinar la unión de la variante SIRP α mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo Accuri C6. Para evaluar el bloqueo de SIRP α de tipo silvestre a cD47, se incubó el tetrámero de SIRP α de tipo silvestre 50 nM con concentraciones titulantes de agentes de bloqueo CD47 durante 30 minutos en hielo. Se usó el clon anti-CD47 B6H12 (eBioscience) como control positivo para el bloqueo. Los datos se analizaron con GraphPad Prism 5. La unión máxima de la variante SIRP α representa el porcentaje de la intensidad de fluorescencia media máxima medida para cada variante.

Derivación y cultivo de macrófagos: Para la derivación de macrófagos humanos, se obtuvieron cámaras del sistema de reducción de leucocitos del Centro de Sangre de Stanford de donantes anónimos. Las células mononucleares de sangre periférica se obtuvieron por centrifugación sobre un gradiente de densidad Ficoll Paque Premium (GE Healthcare). Los monocitos CD14+ se purificaron usando microperlas CD14 (Miltenyi) y un separador AutoMACS Pro (Miltenyi). Los monocitos se diferenciaron en macrófagos mediante cultivo en IMDM+GlutaMax (Invitrogen) + 10 % de suero humano AB (Invitrogen) +1 % de penicilina/estreptomycin durante 7 días, momento en el que se usaron para los ensayos de fagocitosis.

Los macrófagos de ratón se obtuvieron aislando médula ósea de ratones transgénicos C57Bl/Ka Rosa26-mRFP1 y cultivando en RPMI (Invitrogen) +10 % de FBS +1 % de GlutaMax + 1 de % penicilina/estreptomycin suplementada con 10 μ g/ml de M-CSF murino (Peprotech). Después de 7 días de diferenciación, los macrófagos fueron cosechados y utilizados para ensayos de fagocitosis.

Ensayos de fagocitosis *in vitro*: Los ensayos de fagocitosis *in vitro* se realizaron usando macrófagos de ratón y humanos. Para evaluación por citometría de flujo, se añadieron aproximadamente 50.000 macrófagos por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Se preincubaron 200.000 células tumorales GFP+ durante 30 minutos con terapias con anticuerpos o variantes de SIRP α en medio sin suero y después se añadieron a los macrófagos. El clon 2D3 anti-CD47 (eBioscience) y cetuximab (Bristol-Myers Squibb) se usaron como se describe para la opsonización. Los macrófagos y las células diana se incubaron durante 2 horas en una incubadora humidificada a 37° que contenía 5 % de dióxido de carbono. Después de la incubación, las células se lavaron, se retiraron de la placa y se prepararon para citometría de flujo. Las células muertas se excluyeron del análisis mediante tinción con DAPI (Invitrogen). Los macrófagos humanos se identificaron mediante tinción con CD14 antihumano conjugado con Alexa Fluor 647 (BioLegend). Las muestras se analizaron usando un BD Biosciences LSRFortessa con un muestreador de alto rendimiento. El porcentaje de macrófagos que fagocitan células tumorales, representado por los macrófagos GFP+, se determinó usando FlowJo 7.6.4 (Treestar).

Para la visualización de la fagocitosis *in vitro*, se colocaron 50.000 macrófagos en placas de 24 pocillos. Las células tumorales se marcaron con CFSE 5 μ M (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se trataron 200.000 células tumorales CFSE+ con anticuerpos o tratamientos variantes SIRP α durante 30 minutos en medio sin suero, se añadieron a los macrófagos y después se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Después de la incubación, los pocillos se lavaron ampliamente para retirar las células diana residuales. Posteriormente, los pocillos se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia invertido (Leica DMI6000 B). El índice de fagocitosis se calificó como el número de células diana por macrófago multiplicado por 100.

Resultados. Los experimentos *in vivo* que tratan ratones inmunodeficientes xenoinjertados muestran que el tratamiento con los reactivos SIRP α -Fc de alta afinidad bloqueó el crecimiento tumoral. Los ratones trasplantados con células de leucemia HL60 que expresan luciferasa se trataron con reactivos SIRP solubles. La carga tumoral medida por el resplandor emitido por las células luciferasa-HL60 disminuyó a niveles de fondo que indican la eliminación de las células tumorales, mientras que los ratones tratados con control de IgG, el resplandor aumentó, reflejando un mayor crecimiento tumoral. Este resultado fue comparable al observado con el hu5F9 anti-CD47ab. Estos datos muestran que los reactivos SIRP α solubles de alta afinidad son comparables al anticuerpo anti-CD47 bloqueando eficazmente la "señal de no me comas" al unirse al CD47 en la célula HL60 y permitir la fagocitosis y la eliminación de las células.

Ejemplo 2

SIRP α de alta afinidad reduce el umbral para la fagocitosis de macrófagos de las células cancerosas

La capacidad de los tumores para evadir el sistema inmunitario es un sello distintivo emergente del cáncer, y las

nuevas estrategias terapéuticas que dirigen las respuestas inmunitarias contra las células cancerosas son prometedoras en entornos experimentales y clínicos. Los macrófagos comúnmente se infiltran en los tumores y estudios recientes han identificado a CD47 como una señal anti-fagocítica de "no me comas" que se expresa altamente en muchos tipos de cáncer para evitar la destrucción mediada por macrófagos. Los anticuerpos que bloquean la unión de CD47 a SIRP α , un receptor inhibitor en macrófagos, aumenta en gran medida la fagocitosis de las células cancerosas, identificando un nuevo y emocionante eje para manipular con inmunoterapias antitumorales. La evolución dirigida y la ingeniería de proteínas se usaron para modificar el dominio de unión de SIRP α , cuya afinidad de tipo silvestre es demasiado débil para ser terapéuticamente útil, como un antagonista competitivo de alta afinidad de CD47.

Los presentes inventores crearon variantes de SIRP α que se unen a CD47 con un aumento de afinidad de aproximadamente 50.000 veces en relación con SIRP α de tipo silvestre. Cuando se produce como proteínas de fusión multiméricas de alta afinidad SIRP α -Fc, las variantes actúan como agentes únicos para inducir la fagocitosis *in vitro* y reducir el crecimiento de tumores humanos *in vivo*. Si bien los monómeros SIRP α de alta afinidad de dominio único no son suficientes para inducir la fagocitosis máxima por sí solos, mejoran enormemente la eficacia de los anticuerpos monoclonales terapéuticos establecidos cuando se administran en terapias combinadas. Dado que CD47 es un mecanismo generalizado que usan las células tumorales para evadir el sistema inmunitario, las moléculas generadas en este estudio benefician a un gran número de pacientes con cáncer, tanto como monoterapias y como adyuvantes de otros productos biológicos específicos.

Para generar un antagonista de CD47 ideal, se usó ingeniería de proteínas para mejorar la afinidad de SIRP α soluble por CD47 (Figura 1A). Los presentes inventores crearon bibliotecas mutantes del dominio Ig del conjunto V del N-terminal de SIRP α conjugado con Aga2p para la visualización de la superficie de la levadura (Figura 1B). Usando el dominio CD47 IgSF como reactivo de selección, los presentes inventores llevaron a cabo dos 'generaciones' de evolución *in vitro*. La primera generación implicó cinco rondas de selección de una biblioteca mutante agrupada que contenía aleatorizaciones a dos clases de restos de SIRP α : los que contactan con CD47 o los que residen dentro del núcleo hidrófobo (Figura 5A). Las variantes SIRP α de primera generación resultantes se unieron a CD47 con una afinidad 20-100 veces mayor que la SIRP α de tipo silvestre, como se mide mediante resonancia de plasmón superficial. Para obtener variantes de incluso mayor afinidad, los presentes inventores realizaron una segunda generación de evolución dirigida mediante la construcción de una biblioteca que logró la cobertura total de trece restos mutados en los selectores de primera generación. Después de cinco rondas adicionales de selección, los presentes inventores obtuvieron variantes que se unían a CD47 con constantes de disociación (K_D) tan bajas como 34,0 pM y semividas de descomposición ($t_{1/2}$) tan largas como 44 minutos en comparación con K_D 0,3-0,5 μ M y $t_{1/2}$ 1,8 segundos para SIRP α de tipo silvestre (Figura 1C). De manera interesante, las secuencias de las variantes SIRP α de alta afinidad convergieron en un conjunto consensuado de mutaciones. Cuando los presentes inventores injertaron estas nueve sustituciones conservativas en el alelo SIRP α de tipo silvestre predominante (alelo 2), la variante resultante (denominada CV1, variante consenso 1) se unió a CD47 con una afinidad de 11,1 pM (Figura 1C).

La secuencia CV1 tiene los siguientes cambios de aminoácidos, relativos al alelo de tipo silvestre: V6I; V27I; I31F; E47V; K53R; E54Q; H56P; S66T; V92I. CV1 puede comprender, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos del dominio d1 como sigue:

```
(SEQ ID NO:10) EEELQIIQPD KSVLVAAGET ATLRCITISL FPGVPIQWFR GAGPGRVLIY
NQRQGPFPV TTVSDTTKRN NMDFSIRIGN ITPADAGTYY CIKFRKGSPD DVEFKSGAGT
ELSVRAKPS
```

Para comprender si las variantes de SIRP α de alta afinidad conservaron una geometría de unión a CD47 similar a la proteína de tipo silvestre, los presentes inventores determinaron la estructura cristalina de un complejo entre la variante de alta afinidad FD6 y el dominio CD47 IgSF (Figura 1D). El complejo FD6:CD47 se superpuso con el complejo SIRP α :CD47 de tipo silvestre con una desviación cuadrática media de raíz de solo 0,613 Å, indicando un alto grado de similitud estructural y validando los esfuerzos para preservar la geometría de la interacción de tipo silvestre (Figura 1E). Los modos de unión superpuestos de FD6 y SIRP α de tipo silvestre para CD47 indican que competirían por el mismo epítipo de CD47, proporcionando de esta manera el antagonismo potencial máximo. Como una diferencia notable, el bucle C'D de FD6 contiene tres de las cuatro mutaciones de contacto presentes en la secuencia consenso (Figura 1E). Los presentes inventores especularon que estas mutaciones estabilizan el ciclo C'D, que coloca la carga positiva de Arg53 en un grupo de ácidos glutámicos en CD47 (Figura 1E). El resto de la interfaz de unión entre FD6 y CD47 se parece mucho a la interfaz SIRP α :CD47 de tipo silvestre, siendo la excepción más notable la mutación de Ile31 a Phe. Estos estudios estructurales indican que las variantes de SIRP α de alta afinidad pueden servir como antagonistas efectivos de CD47.

Para probar las propiedades funcionales de las variantes SIRP α de alta afinidad, los presentes inventores primero examinaron su capacidad para unirse y antagonizar CD47 en la superficie de las células cancerosas. Los presentes inventores encontraron que las variantes de SIRP α con mayor afinidad por CD47 exhibían una mayor potencia en la unión (Figuras 8a, c) y en el bloqueo de CD47 de la superficie celular (Figura 2a y Figura 8b). Como monómeros de dominio único, ambas variantes FD6 y CV1 exhibieron un potente antagonismo con respecto a SIRP α de tipo silvestre.

De manera importante, ambas variantes de alta afinidad eran antagonistas de CD47 más potentes que los fragmentos Fab producidos a partir del clon de anticuerpo anti-CD47 B6H12, un antagonista de CD47 bien caracterizado que demuestra efectividad terapéutica *in vitro* e *in vivo* (Figura 8a).

5 A continuación los presentes inventores evaluaron la capacidad de las variantes de SIRP α de alta afinidad para aumentar la fagocitosis *in vitro* mediante el co-cultivo de macrófagos y células tumorales en presencia de agentes bloqueantes de CD47. Como las proteínas de fusión con el fragmento Fc de la IgG4 humana (hlgG4), las variantes de SIRP α de alta afinidad condujeron a aumentos dramáticos en la fagocitosis de las células cancerosas como se visualiza por microscopía (Figura 2b). Para obtener mediciones cuantitativas de fagocitosis, los macrófagos humanos primarios y las células tumorales GFP+ se co-cultivaron con agentes bloqueantes de CD47 y después se analizaron por citometría de flujo (Figura 2c). Usando múltiples líneas celulares de cáncer que representan tanto tumores malignos sólidos como hematológicos, los presentes inventores descubrieron que el tratamiento con concentraciones saturantes de variantes de SIRP α -hlgG4 de alta afinidad produjo aumentos dramáticos en la fagocitosis en relación con los controles de SIRP α -hlgG4 de tipo silvestre (Figura 2d). Aunque las variantes de SIRP α -hlgG4 de alta afinidad y un anticuerpo anti-CD47 con isotipo coincidente produjeron niveles comparables de fagocitosis a concentraciones saturantes (Figura 2d), las variantes de SIRP α de alta afinidad demostraron una clara ventaja cuando se valoraron para generar curvas de dosis-respuesta (Figura 2e). Las altas afinidades de FD6-hlgG4 y CV1-hlgG4 correspondieron a una disminución de las CE₅₀, indicando una inducción más potente de fagocitosis.

20 De manera interesante, no se observaron aumentos sustanciales en la fagocitosis después del tratamiento con concentraciones saturantes de monómeros SIRP α de alta afinidad (Figura 2d), lo que sugiere que el bloqueo de CD47 solo no es suficiente para inducir la fagocitosis máxima. Por consiguiente, los presentes inventores hipotizaron que el tratamiento con monómeros SIRP α de alta afinidad reduciría el umbral de fagocitosis en presencia de anticuerpos monoclonales específicos de tumor. Para investigar esta hipótesis, los presentes inventores realizaron ensayos de fagocitosis usando anticuerpos dirigidos a células DLD-1, una línea celular de cáncer de colon humano. Cuando se añadieron monómeros SIRP α de alta afinidad solos o en combinación con un anticuerpo de control de isotipo inespecífico, se observaron niveles basales de fagocitosis (Figura 2f).

30 El tratamiento con el clon 2D3 anti-CD47, que se une a CD47 pero no bloquea la interacción con SIRP α , o un anticuerpo anti-EpCam produjo niveles moderados de fagocitosis. Sin embargo, tras la adición de monómero SIRP α de alta afinidad FD6 a ambos tratamientos con anticuerpos, los macrófagos exhibieron aumentos significativos en la fagocitosis (Figura 2f). Por lo tanto, el bloqueo de CD47 reduce el umbral para la fagocitosis de macrófagos en presencia de otros estímulos activadores, tales como el anticuerpo Fc.

35 Para demostrar las implicaciones clínicas de este principio, los presentes inventores investigaron la capacidad de los monómeros SIRP α de alta afinidad para mejorar la eficacia de los anticuerpos monoclonales establecidos actualmente usados como terapias contra el cáncer. En primer lugar, los ensayos de fagocitosis se realizaron utilizando células de cáncer de colon DLD-1 tratadas con el anticuerpo anti-EGFR cetuximab. La fagocitosis se evaluó en respuesta a concentraciones de titulación de cetuximab solo, en combinación con monómero SIRP α de tipo silvestre, o en combinación con monómeros SIRP α de alta afinidad. Con respecto a tanto cetuximab solo como en combinación con monómero SIRP α de tipo silvestre, la combinación de cetuximab más monómero SIRP α de alta afinidad produjo un aumento significativo tanto en la efectividad máxima como en la potencia de cetuximab (Figura 2g). Se observaron efectos similares cuando se evaluó la fagocitosis con células de linfoma Raji tratadas con concentraciones titulantes de rituximab, un anticuerpo anti-CD20 (Figura 2h). De nuevo, los monómeros SIRP α de alta afinidad aumentaron tanto la efectividad máxima como la potencia del rituximab. En entornos clínicos, los anticuerpos monoclonales a menudo solo logran respuestas limitadas, y la recaída es común después del tratamiento. Los monómeros SIRP α de alta afinidad ofrecen una solución a estos problemas al servir como adyuvantes universales para los anticuerpos específicos de tumores.

50 A continuación los presentes inventores evaluaron la efectividad de las variantes SIRP α de alta afinidad *in vivo* usando modelos de tumor de ratón. Como un modelo agresivo de cáncer de colon humano en fase avanzada, Las células DLD-1 GFP-luciferasa⁺ se injertaron en las cavidades peritoneales de ratones NSG (Figura 3a). Después de confirmar el injerto mediante imágenes de bioluminiscencia, el tratamiento diario se inició con el control del vehículo o la variante SIRP α de alta afinidad CV1-hlgG4 como monoterapia. La monitorización de la bioluminiscencia del flujo total reveló una disminución moderada en las tasas de crecimiento tumoral durante las semanas iniciales de tratamiento con CV1-hlgG4 (Figura 9), lo que condujo a un beneficio de supervivencia significativo con el tiempo (Figura 3b). Dado que la pérdida de glóbulos rojos es el principal efecto secundario observado en el tratamiento con anticuerpos antiCD47 de ratón, los presentes inventores examinaron la sangre de ratones tratados con CV1-hlgG4 para detectar disminuciones similares. La citometría de flujo reveló que CV1-hlgG4 unía todas las células en la sangre (Figura 3c) y resultó en una disminución moderada en el hematocrito (Figura 3d). Sin embargo, como se observó previamente, el tratamiento prolongado no provocó más toxicidad.

65 Como CV1-hlgG4 exhibió eficacia antitumoral como agente único, a continuación evaluaron su efectividad en un modelo de cáncer de vejiga humano, un tipo de cáncer para el cual no existen actualmente productos biológicos específicos. Se inyectaron células de cáncer de vejiga GFP-luciferasa⁺ 639-V en el tejido subcutáneo dorsal de ratones NSG. El injerto se confirmó mediante imágenes de bioluminiscencia y los ratones se aleatorizaron en grupos para el

tratamiento diario con control de vehículo o CV1-hlgG4. El tratamiento con CV1-hlgG4 redujo sustancialmente las tasas de crecimiento tumoral según lo evaluado por formación de imagen de bioluminiscencia (Figuras 3e, f). Los volúmenes tumorales se evaluaron inmediatamente antes de la muerte del primer ratón tratado con control, en ese punto, los tumores grandes eran medibles en todos los ratones de control y no se palpaban tumores discernibles en los ratones tratados con CV1-hlgG4 (Figura 3g). En consecuencia, se observó un notable beneficio en la supervivencia, incluso después de suspender el tratamiento una vez que todos los ratones de control habían muerto (Figura 3h).

Como se observó previamente, El tratamiento con CV1-hlgG4 resultó en disminuciones en los índices de glóbulos rojos (Figura 10a). Los ratones tratados con CV1-hlgG4 también desarrollaron tejido estromal palpable que rodea los sitios de injerto tumoral. El examen histopatológico de este tejido reveló pequeños nódulos tumorales incrustados en un infiltrado inflamatorio extenso que contiene macrófagos (Figuras 10b, c).

A continuación los presentes inventores investigaron el efecto adyuvante de los monómeros SIRP α de alta afinidad *in vivo*. En un modelo localizado de linfoma humano, las células GFP-luciferasa+ Raji se injertaron subcutáneamente en los flancos de ratones NSG. Después de confirmar el injerto mediante imágenes de bioluminiscencia, los ratones se aleatorizaron en grupos para un curso de tres semanas de tratamiento diario con cualquier vehículo, monómero CV1 solo, rituximab solo, o una combinación de rituximab más monómero CV1. El tratamiento con monómero CV1 o rituximab solos solo redujo el crecimiento tumoral, mientras que el tratamiento con la terapia combinada erradicaba drásticamente los tumores en la mayoría de los ratones (Figuras 4a, b, c). Durante el periodo de tratamiento, no se observaron disminuciones significativas de glóbulos rojos (Figuras 11a, b, c). Los efectos de cada terapia se tradujeron en tendencias respectivas en las curvas de supervivencia (Figura 4d). De manera notable, el efecto sinérgico de combinar un monómero SIRP α de alta afinidad con un anticuerpo monoclonal específico de tumor condujo a curas de larga duración en la mayoría de los animales, incluso después de que se interrumpió el tratamiento (Figura 4d).

El desarrollo de las variantes SIRP α de alta afinidad representa un esfuerzo de diseño de fármaco multidisciplinario, racional, procedente de la ingeniería molecular a nivel de proteínas, a validación *in vitro* usando células efectoras inmunitarias purificadas, y finalmente para evaluación terapéutica en modelos animales. Si bien los estudios anteriores han demostrado el valor de apuntar a la interacción CD47-SIRP α como una intervención inmunitaria para el cáncer, aquí los presentes inventores han manipulado aún más este sistema para generar antagonistas de CD47 altamente eficaces y potentes que exhiben propiedades óptimas como terapéuticos.

Los descubrimientos *in vitro* e *in vivo* de los presentes inventores proporcionan una nueva visión de la actividad de los macrófagos contra el cáncer y su respuesta a las terapias inmunomoduladoras. Como se observa con monómeros SIRP α de alta afinidad, el bloqueo de CD47 solo no es suficiente para inducir la fagocitosis máxima. De manera similar, cuando CD47 es libre de transducir señales inhibitorias a través de SIRP α en macrófagos, los anticuerpos monoclonales no alcanzan su máxima eficacia. Sin embargo, los macrófagos se estimulan de manera robusta cuando CD47 se bloquea por monómeros SIRP α de alta afinidad en presencia del anticuerpo Fc unido a la superficie. Las proteínas de fusión SIRP α -Fc de alta afinidad y los anticuerpos anti-CD47 combinan un componente bloqueante de CD47 y un anticuerpo pro-fagocítico Fc en una sola molécula; por lo tanto, exhiben efectividad como agentes únicos pero tienen un mayor potencial de toxicidad fuera de la diana. Por otro lado, la combinación de monómeros SIRP α de alta afinidad con un anticuerpo monoclonal antitumoral separado, tales como rituximab, mejora específicamente las respuestas antitumorales. Si bien esta estrategia ofrece beneficios claros, particularmente una falta de toxicidad discernible, es dependiente de la disponibilidad y efectividad de los anticuerpos monoclonales clínicamente aprobados para lograr respuestas máximas.

Un informe reciente sugirió que las proteínas de fusión SIRP α -Fc de tipo silvestre podrían usarse para tratar la leucemia humana. Sin embargo, el presente estudio muestra que la afinidad débil entre SIRP α de tipo silvestre y CD47 limita el potencial de dicha terapia. Los efectos observados por otros probablemente fueron mediados principalmente por los efectos pro-fagocíticos de Fc, a diferencia del antagonismo de CD47, ya que la fagocitosis solo era evidente cuando los macrófagos se preactivaron con endotoxina e interferón- γ . *In vivo*, la falta de reactividad cruzada entre SIRP α humano de tipo silvestre y CD47 de ratón modela insuficientemente el tratamiento y la toxicidad en humanos donde existe un gran sumidero de antígeno debido a la expresión de CD47 en todas las células del cuerpo.

Los reactivos SIRP α de alta afinidad constituyen una clase novedosa de productos biológicos antitumorales que son susceptibles de ingeniería adicional. Las modificaciones pueden diseñarse para alterar la efectividad, especificidad, penetrancia tisular, aclaramiento y toxicidad. Adicionalmente, dado que muchos tumores sobreexpresan CD47 y los niveles de expresión se correlacionan con malos resultados para los pacientes, las variantes de SIRP α de alta afinidad pueden adaptarse como agentes de formación de imagen no invasivos para el cáncer. El CD47 se usa comúnmente por las células tumorales para evadir el sistema inmunitario, de esta manera, las variantes de SIRP α de alta afinidad podrían ser valiosas terapias para diversos cánceres humanos. Las proteínas de fusión SIRP α -Fc de alta afinidad demuestran efectividad como agentes únicos y, por lo tanto, pueden ser particularmente útiles como tratamientos para cánceres para los que actualmente no existen terapias dirigidas. Por otra parte, los monómeros SIRP α de alta afinidad pueden usarse como adyuvantes universales para las terapias de anticuerpos monoclonales convencionales. De forma global, este estudio profundiza el conocimiento de las respuestas de los macrófagos a las células neoplásicas y respalda el uso de los reactivos SIRP α de alta afinidad como terapias inmunológicas para el cáncer.

MÉTODOS

Expresión y purificación de proteínas. El dominio CD47 IgSF (restos 1-117), con una mutación C15G y una etiqueta de 8 histidina C-terminal, se secretó de células de *Trichoplusia ni* (Hi-5) usando baculovirus y se purificaron por Ni-NTA y cromatografía de exclusión por tamaño con una columna Superdex-75. Para generar CD47 minimizado con glucano para cristalografía, CD47 se co-expresó con endoglicosidasa-H (endoH) en presencia de kifunensina. Las variantes monoméricas de SIRP α (restos 1-118) se expresaron como fusiones de MBP en el periplasma de *E. coli* BL-21 (DE3) usando un vector de expresión pMal-p2X modificado (New England Biolabs) que contiene un sitio de escisión de proteasa de rinovirus 3C después de la etiqueta MBP y una etiqueta de 8 histidina C-terminal. Las células fueron inducidas a una DO₆₀₀ de 0,8 con IPTG 1 mM y se incubaron con agitación a 22 °C durante 24 horas. La proteína periplásmica se obtuvo por choque osmótico y las proteínas de fusión MBP se purificaron usando cromatografía de ácido de níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA). Las proteínas eluidas se digirieron con proteasa 3C a 4 °C durante 12 horas para retirar MBP y se purificaron adicionalmente mediante una etapa de cromatografía de Ni-NTA adicional, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño con una columna Superdex-S75. Para ensayos de fagocitosis *in vitro* y experimentos *in vivo*, se retiró la endotoxina usando Triton X-114 como se describió previamente y se confirmó la eliminación de endotoxina usando el Kit de Ensayo de Endotoxina LAL Cromogénico ToxinSensor (Genscript). Las fusiones de SIRP α -Fc se produjeron mediante la clonación de variantes de SIRP α en un vector pFUSE-hlgG4-Fc modificado (Invivogen) con una secuencia de señal IL-2 y la mutación de ingeniería Ser228 Pro. Las proteínas se expresaron mediante transfección transitoria en células Freestyle 293-F (Invitrogen) y se purificaron sobre columnas de proteína A HiTrap (GE Healthcare). El clon quimérico anti-CD47 B6H12-hlgG4 se produjo de forma recombinante mediante expresión estable en células CHO (Lonza).

Para obtener CD47 biotinilado y SIRP α , las proteínas se expresaron con una etiqueta de péptido aceptor de biotina terminal carboxi (GLNDIFEAQKIEWHE) y se purificaron como se describió anteriormente. Las proteínas purificadas se biotinilaron *in vitro* con ligasa BirA y después se repurificaron a partir de la mezcla de reacción por cromatografía de exclusión por tamaño.

Preparación de fragmentos Fab de B6H12. El anticuerpo B6H12 se desaló en citrato sódico 20 mM, pH 6,0, cisteína 25 mM, EDTA 5 mM y se diluyó a una concentración de 4 mg/ml. El anticuerpo después se mezcló con 250 μ l de resina de ficina inmovilizada (Thermo Scientific) por ml de anticuerpo y se incubó con rotación a 37 °C durante cinco horas. Los fragmentos digeridos se purificaron pasando la mezcla de reacción sobre una columna monoQ (Fab B6H12 residía en el flujo), seguido de filtración en gel con una columna Superdex-200.

Visualización de levadura y generación de biblioteca de variantes SIRP α . El dominio V-set N-terminal de SIRP α (restos 1-118) se mostró en la superficie de la cepa EBY100 de *S. cerevisiae* como una fusión C terminal a Aga2 usando el vector pCT302 como se describió previamente. La biblioteca agrupada de primera generación se generó mediante dos reacciones de PCR de ensamblaje separadas que aleatorizaron los restos de contacto CD47 y los restos hidrófobos 'centrales' de SIRP α , respectivamente, usando los siguientes juegos de cebadores con codones degenerados: Conjunto de cebadores de PCR de restos de contacto, aleatorizando Ser29=RST, Leu30=NTT, Ile31=NTT, Pro32=CNT, Val33=NTT, Gly34=RST, Pro35=CNT, Gln52=SAW, Lys53=ARG, Glu54=SAW, Ser66=RST, Thr67=RST, Lys68=ARG, Arg69=ARG, Phe74=NTT, Lys93=ANG, Lys96=ANG, Gly97=RST, Ser98=RST y Asp100=RAS:

(SEQ ID NO:11) 5'GAGGAGGAGCTGCAGGTGATTCAGCCTGACAAGTCCGTATCAGTTGCAGCT3'; (SEQ ID NO:12) 5'GGTCACAGTGCAGTGCAGAATGGCCGACTCTCCAGCTGCAACTGATACGGA3'; (SEQ ID NO: 13) 5'CTGCACTGCACTGTGACCRSTNTTNTTTCNTNTTRSTCNTATCCAGTGGTTCAGAGGA3'; (SEQ ID NO: 14) 5'ATTGTAGATTAATTCCTCCGGGCTGGTCCAGCTCCTCTGAACCACTGGAT3'; (SEQ ID NO:15) 5'CGGGAATTAATCTACAATSAWARGSAWGGCCACTTCCCCGGGTAACAACCTGTTTCAGAG3'; (SEQ ID NO:16) 5'GTTACTGATGCTGATGGAAANGTCCATGTTTTCCYTCYASYASYCTCTGAAACAGTTGTTAC3'; (SEQ ID NO:17) 5'TCCATCAGCATCAGTAACATCACCCAGCAGATGCCGGCACCTACTACTGTGTG3'; (SEQ ID NO:18) 5'TCCAGACTTAAACTCCGTWYAGGASYASYCNTCCGGAACNTCACACAGTAGTA GGTGCC3'; (SEQ ID NO:19) 5'ACGGAGTTTAAAGTCTGGAGCAGGCACTGACTGTCTGTGCGTGCCA AACCTCT3'

Cebadores de PCR de resto de 'núcleo', aleatorizando Leu4, Val6, Val27, Ile36, Phe38, Leu47, Ile49, Tyr50, Phe57, Val60, Met72, Phe74, Ile76, V92, Phe94 y Phe103 a NTT:

(SEQ ID NO:20) 5'GGATCCGAGGAGGAGNTTCAGNTTATTCAGCCTGACAAGTCCGTATCAGTTGCAGCTGGAGAG3'; (SEQ ID NO:21) 5'GGGCCCCACAGGGATCAGGGAGGTAANAGTGCAGTGCAGAATGGCCGACTCTCCAGCTGCAAC3'; (SEQ ID NO:22) 5'CTGATCCCTGTGGGGCCNTTCAGTGGNTTAGAGGAGCTGGACCAGCCCGGAA3'; (SEQ ID NO:23) 5'GTGGCCTTCTTTTGATTAANAANA NTTCCCGGGCTGGTCCAGC3'; (SEQ ID NO:24) 5'AATCAAAAAGAAGGCCACNTTCCCC GGNTTACAACCTGTTTCAGAGTCCACAAAGAGAGAAAAC3'; (SEQ ID NO:25) 5'GCCGTCATCTG CTGGGGTGTGTTACTGATGCTAANGGAAANGTCAANGTTTTCTCTTTGTGGA3'; (SEQ ID NO:26) 5'ACCCAGCAGATGCCGGCACCTACTACTGTNTTAAGNTTCGGAAAGGGAGCCCTGACACGGAG3', (SEQ ID NO:27) 5'AGAGGGTTTGGCAGCACAGACAGCTCAGTGCCTGCTCCAGACTTAANCTCCGTGTCAGGGCTCCC3'.

Los productos de PCR se amplificaron aún más con cebadores que contenían homología con el vector pCT302, combinado con vector de ADN pCT302 linealizado y co-electroporado en levadura EBY100. La biblioteca resultante

contenía $4,0 \cdot 10^8$ transformantes.

La biblioteca de segunda generación se generó y se transformó de manera idéntica como la biblioteca de primera generación, pero se ensambló con los siguientes cebadores, aleatorizando Leu4=NTT, Val6=NTT, Val27=NTT, Ile31=WYT, Glu47=SWA, Lys53=ARG, Glu54=SAK, His56=CNT, Ser66=RST, Lys68=ARG, Val92=NTT, Phe94=NTT, Phe103=NTT:

5 (SEQ ID NO:28) 5'GGATCCGAGGAGGAGNTTCAGNTTATTACAGCTGACAAGTCCGTATC3'; (SEQ ID NO:29)
 5'GTGCAGTGCAGAATGGCCGACTCTCCAGCTGCAACTGATACGGACTTGTGAGGCTGAA3'; (SEQ ID NO:30)
 5'CATTCTGCACTGCACTNTTACCTCCCTGWYTCCTGTGGGGCCCATCCAG3'; (SEQ ID NO:31)
 10 5'CGGGCTGGTCCAGCTCCTCTGAACCACTGGATGGGCCCCACAGG3'; (SEQ ID NO:32)
 5'GAGCTGGACCAGCCGGSWATTAATCTACAATCAAARGSAKGCCNTTCCCGGGTAACAACCTGTTTCAGA
 G3; (SEQ ID NO:33) 5'GAAAAGTCCATGTTTTCTCTCYTTGTASYCTCTGAAACAGTTGTTAC3'; (SEQ ID NO:34)
 5'AGAGAAAACATGGACTTTTCCATCAGCATCAGTAACATCACCCAGCAGATGCC GGCAC3'; (SEQ ID NO:35)
 5'CTCCGTGCAGGGCTCCCTTTCCGAANCTTAANACAGTAGTAGGTGCCGGCATC TGCTG3', (SEQ ID NO:36)
 15 5'GAGCCCTGACACGGAGNTTAAGTCTGGAGCAGGCACTGAGCTGTCTGTGCGTGCCAA ACCCTCT3'. La
 biblioteca resultante contenía 2×10^8 transformantes.

20 *Selección de biblioteca de primera generación.* La levadura transformada se expandió en medio líquido SDCAA a 30°C y se indujo en medio líquido SGCAA a 20°C . Todas las etapas de selección se llevaron a cabo a 4°C . Para la primera ronda de selección, 4×10^9 levadura inducida, representando una cobertura diez veces mayor del número de transformantes de la biblioteca, se resuspendió en 5 ml de PBE (solución salina tamponada con fosfato suplementada con albúmina de suero bovino al 0,5 % y EDTA 0,5 mM). La levadura se mezcló con 500 μl de microperlas de estreptavidina paramagnética (Miltenyi) que se pre-recubrieron con CD47 biotinilado y la mezcla se incubó con rotación durante una hora. Las levaduras se sedimentaron por centrifugación a 5.000 g durante cinco minutos y se lavó dos veces con 10 ml de PBE. La levadura marcada magnéticamente se resuspendió en 5 ml de PBE y se separó con una columna LS MACS de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi). La levadura eluida se granuló, se resuspendió en medio SDCAA y se expandió para la siguiente ronda de selección. Se realizaron cuatro rondas adicionales de selección de manera similar a la primera ronda con las siguientes modificaciones: 1×10^6 de levadura se resuspendió en 500 μl de PBE que contenía anticuerpo anti-c-Myc marcado con FITC (Miltenyi) o disminuyó sucesivamente las concentraciones de proteína CD47 biotinilada, de $1 \mu\text{M}$ a 100 nM. Después de la incubación durante una hora, la levadura se lavó con PBE y para las selecciones con CD47, se marcó con estreptavidina-PE (Invitrogen) o estreptavidina-Alexa Fluor 647 (producido en casa) durante 15 minutos. La levadura se lavó dos veces más con PBE y se marcó magnéticamente con 50 μl de las microperlas anti-fluoróforo apropiadas (anti-FITC, anti-PE o anti-Alexa Fluor 647; Miltenyi) durante 15 minutos. La levadura se lavó una vez, se resuspendió en 3 ml de PBE y se separó con una columna LS como en la primera ronda.

35 *Selección de biblioteca de segunda generación.* Para las dos primeras rondas de selección de la biblioteca de segunda generación, las levaduras se seleccionaron con proteína monomérica CD47 biotinilada, como en las rondas dos a cinco de las selecciones de primera generación. La primera ronda se seleccionó con CD47 biotinilado 20 nM y la segunda ronda con CD47 biotinilado 1 nM, usando un volumen de tinción mayor (10 ml de PBE) para evitar el agotamiento del ligando. Para todas las rondas posteriores de selección, se realizó una selección cinética. Brevemente, la levadura se tiñó con CD47 biotinilado 20 nM durante una hora, se lavó con PBE y luego se resuspendió en 500 μl de PBE que contenía CD47 no biotinilado 1 μM . Las células se incubaron a 25°C durante 90 minutos (ronda tres) o 300 minutos (rondas cuatro y cinco), después de lo cual se lavaron con PBE enfriado en hielo y se tiñeron con estreptavidina marcada con fluorescencia. Para las rondas uno a cuatro, la levadura se separó usando MACS, como se describe para la biblioteca de primera generación. Para la quinta ronda de selección, las levaduras se marcaron conjuntamente con anti-c-Myc marcado con FITC y estreptavidina-Alexa Fluor 647 y se seleccionaron con un clasificador de células FACSAria (BD Biosciences).

40 *Resonancia de plasmón superficial (SPR).* Los experimentos se realizaron con un Biacore T100 a 25°C . Las concentraciones de proteínas se cuantificaron mediante absorbancia a 280 nm con un espectrómetro Nanodrop2000 (Thermo Scientific). Se usó un chip sensor Biacore SA (GE Healthcare) para capturar CD47 biotinilado ($R_{\text{max}} \sim 150 \text{ UR}$). Una proteína biotinilada no relacionada se inmovilizó con un valor de UR que coincide con el de la superficie de referencia para controlar la unión no específica. Las mediciones se realizaron con diluciones en serie de las variantes SIRP α en tampón HBS-P+ (GE Healthcare). La superficie del CD47 se regeneró mediante tres inyecciones de 60 segundos de MgCl_2 2 M. Todos los datos se analizaron con el software de evaluación Biacore T100 versión 2.0 con un modelo de unión Langmuir 1:1.

50 *Cristalización y determinación estructural del complejo FD6:CD47.* CD47 de glucano minimizado y FD6 derivado de *E. coli* se mezclaron en una proporción 1:1 y se digirieron con carboxipeptidasas A y B para retirar sus etiquetas de histidina 8x C-terminal. El complejo FD6:CD47 digerido se purificó por filtración en gel en solución salina tamponada con HEPES (HBS; HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM) con una columna Superdex-75 y se concentró a 22 mg/ml. Se obtuvieron cristales mediante la adición de 0,1 μl de proteína a un volumen igual de sulfato de amonio 2,0 M y Tris 0,1 M pH 7,3, y se crioprotegieron en aceite de parafina. Los estudios de difracción se realizaron en la línea de luz 8-2 en Advanced Light Source (Berkeley, CA, EE.UU.). Se obtuvo un conjunto de datos anisotrópico de 1,9 Å y se procesó con HKL-3000. El complejo FD6:CD47 se resolvió mediante reemplazo molecular con los modelos

individuales de CD47 y SIRP α del código de acceso 2JJS del Protein Data Bank. El refinamiento se llevó a cabo usando PHENIX y el ajuste del modelo realizado con COOT. Se usó aplanamiento de disolvente a granel para la corrección de disolvente. El refinamiento inicial usó refinamiento de cuerpo rígido, coordenadas y en espacio real, junto con el refinamiento individual del parámetro de desplazamiento atómico. El refinamiento de TLS se añadió en iteraciones de refinamiento posteriores.

Líneas celulares y transducción de GFP-luciferasa⁺. Células DLD-1 (ATCC), células HT-29 (ATCC), células Raji (ATCC), células Jurkat (ATCC) y células 639-V (DSMZ) se cultivaron en RPMI+GlutaMax (Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Omega Scientific), 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin (Invitrogen). Las líneas GFP-luciferasa⁺ se generaron por transducción usando un vector lentivírico puro basado en VIH pCDH-CMV-MCS-EF1 (Systems Biosciences) diseñado para expresar una proteína de fusión eGFP-luciferasa2 (p μ l4). Las líneas estables se crearon clasificando la expresión de GFP en los clasificadores de células FACSAria II (BD Biosciences).

Ensayos de unión a CD47 basados en células. Las concentraciones variables de monómeros SIRP α biotinilados, las proteínas de fusión SIRP α -hlgG4 o los anticuerpos anti-CD47 se incubaron con células cancerosas como se indica. La unión de monómeros biotinilados se detectó usando estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 647 100 nM como reactivo de tinción secundaria y se analizó en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences). La unión de las proteínas de fusión SIRP α -hlgG4 o los anticuerpos anti-CD47 se detectó con el anticuerpo IgG anti-humano de cabra (Invitrogen) y se analizó en un LSRFortessa con muestreador de alto rendimiento (BD Biosciences). Los datos representan la intensidad de fluorescencia media normalizada a la unión máxima para cada clase de reactivos, y los puntos se ajustaron a las curvas dosis-respuesta sigmoidales usando Prism 5 (Graphpad).

Ensayos de bloqueo de CD47 basados en células. El WTa1d1 SIRP α biotinilado se incubó con estreptavidina conjugada con Alex Fluor 647 para formar tetrámeros WTa1d1 SIRP α . Los tetrámeros 100 nM WTa1d1 SIRP α se combinaron con concentraciones de titulación de antagonistas de CD47 y se añadieron simultáneamente a 50.000 células GFP-luciferasa⁺ Raji. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C y después se lavaron para retirar el tetrámero no unido. Las muestras se tiñeron con DAPI (Sigma) para excluir las células muertas, y se analizó la fluorescencia usando un LSRFortessa con una muestra de alto rendimiento (BD Biosciences). Los datos representan la intensidad de fluorescencia media geométrica analizada usando FlowJo v9.4.10 (Tree Star) normalizada a la unión máxima del tetrámero, y se ajustaron a las curvas de respuesta de dosis sigmoideas usando Prism 5 (Graphpad).

Derivación de macrófagos y ensayos de fagocitosis. Se obtuvieron cámaras del sistema de reducción de leucocitos (LRS) del Centro de sangre de Stanford de donantes anónimos, y las células mononucleares de sangre periférica se enriquecieron mediante centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare). Los monocitos se purificaron en un AutoMACS (Miltenyi) usando microperlas anti-CD14 (Miltenyi) y se diferenciaron en macrófagos por cultivo durante 7-10 días en IMDM + GlutaMax (Invitrogen) suplementado con suero humano AB al 10 % (Invitrogen) y 100 U/ml de penicilina y estreptomycin 100 μ g/ml (Invitrogen). Los ensayos de fagocitosis se realizaron mediante co-cultivo de 50.000 macrófagos con 100.000 células tumorales GFP⁺ durante 2 horas, después se analizó usando un analizador de células LSRFortessa con muestreador de alto rendimiento (BD Biosciences). Los anticuerpos usados para el tratamiento incluyeron: control de isotipo IgG1 de ratón (eBioscience), clon 2D3 anti-CD47 (eBioscience), anti-EpCam (BioLegend), cetuximab (Bristol-Myers Squibb) y rituximab (Genentech). Los macrófagos se identificaron por citometría de flujo usando anticuerpos anti-CD14, anti-CD45 o anti-CD206 (BioLegend). Las células muertas se excluyeron del análisis mediante tinción con DAPI (Sigma). La fagocitosis se evaluó como el porcentaje de macrófagos GFP⁺ usando FlowJo v9.4.10 (Tree Star) y se normalizó a la respuesta máxima de cada donante independiente contra cada línea celular. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de 2 vías con pruebas posteriores de Bonferroni y, cuando se indicó, los datos se ajustaron a las curvas dosis-respuesta sigmoidales usando Prism 5 (Graphpad).

Formación de imagen de células vivas de fagocitosis. Los macrófagos de ratón RFP⁺ se generaron y se evaluaron en ensayos de imágenes de células vivas como se describió previamente. Brevemente, las células de médula ósea se aislaron de ratones transgénicos C57BL/K_a Rosa26 mRFP1 y se diferenciaron en 10 ng/ml de M-CSF murino (Peprotech). 500.000 células Raji se marcaron con 0,5 μ M CFSE (Invitrogen) y se co-cultivaron con 50.000 macrófagos RFP⁺ y se formaron imágenes usando un BioStation IMQ (Nikon) equilibrado a 37 °C y 5 % de dióxido de carbono.

Ratones. Se usaron ratones Nod.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) para todos los experimentos *in vivo*. Los ratones se injertaron con tumores aproximadamente a las 6-10 semanas de edad y los experimentos se realizaron con cohortes de 8-15 ratones emparejados por edad y sexo. Los ratones se mantuvieron en una instalación de barrera bajo el cuidado del Centro de Servicios Veterinarios de Stanford y se manejaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el Panel Administrativo de la Universidad de Stanford sobre Cuidado de Animales de Laboratorio.

Modelos tumorales. Para modelar el cáncer de colon humano, se inyectaron 1,10⁵ células DLD-1 GFP-luciferasa⁺ en las cavidades peritoneales de ratones NSG. Los nódulos tumorales se visualizaron en un microscopio de disección fluorescente M205 FA (Leica) equipado con una cámara DFC 500 (Leica). El cáncer de vejiga se modeló por un injerto de 1,25·10⁵ células 639-V GFP-luciferasa⁺ en el tejido subcutáneo dorsal de ratones NSG en Matrigel al 25 % (BD Biosciences). 1-10⁶ células Raji GFP-luciferasa⁺ se injertaron por vía subcutánea en el flanco inferior para un modelo

5 localizado de linfoma humano. En todos los modelos, el tratamiento se inició tras la confirmación del injerto y continuó como se indica. Para todos los tratamientos, se administraron 200 µg de variante o anticuerpo SIRPα mediante inyección intraperitoneal en un horario diario. El crecimiento del tumor se controló mediante imágenes de bioluminiscencia, y se midieron las dimensiones del tumor para calcular los volúmenes de acuerdo con la fórmula elipsoide ($\pi/6 \cdot \text{longitud} \cdot \text{anchura}^2$). La significación estadística se determinó mediante la prueba de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis con las pruebas posteriores de Dunn, según corresponda. La supervivencia se analizó mediante la prueba de Mantel-Cox.

10 *Análisis hematológico.* Se extrajo sangre del plexo retroorbital y se recogió en tubos Microtainer de dipotasio-EDTA (BD Biosciences). Los parámetros hematológicos se evaluaron usando un analizador HemaTrue (Heska). La significación estadística se determinó mediante ANOVA de 2 vías con prueba posterior de Bonferroni. La unión de las variantes de SIRPα-Fc a la sangre completa de ratón se determinó por citometría de flujo usando el anticuerpo IgG anti-humano de cabra Alexa Fluor 647 (Invitrogen).

15 *Formación de imágenes de bioluminiscencia.* Se inyectaron a los ratones anestesiados 200 µl de sal de potasio D-luciferina (luciérnaga) (Biosynth) reconstituida a 16,67 mg/ml en PBS estéril. Las imágenes de bioluminiscencia se realizaron usando un espectro IVIS (Caliper Life Sciences) durante 20 minutos para registrar la radiación máxima. Los valores máximos de flujo total se evaluaron a partir de la región anatómica de interés utilizando Living Image 4.0 (Caliper Life Sciences) y se usaron para el análisis.

20 *Secuencias proteicas.* Entre las proteínas usadas en los ejemplos descritos en el presente documento, se incluyen los siguientes:

25 FD6-hlgG4 (FD6 subrayado, IgG4 S228P humana en negrita), que incluye las regiones CH2, CH3 y bisagras de IgG4 humana, y el dominio d1 de SIRPα FD6 de alta afinidad:

(SEQ ID NO:40)
EEEEVQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGFPRVTTISE
TTRRENMDFSISISNITPADAGTYCYIKFRKGGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPSAAAPPCPPCPA
 PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ
 EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30 CV1-hlgG4 (CV-1 subrayado, IgG4 S228P humana en negrita), que incluye las regiones CH2, CH3 y bisagras de IgG4 humana, y el dominio d1 de SIRPα CV1 de alta afinidad. Nótese que las sustituciones de aminoácidos CV1 están "construidas" en el alelo 2 de tipo silvestre humano:

(SEQ ID NO:41)
EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGFPRVTTVS
DTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGGSPDVEFKSGAGTELSVRAKPSAAAPPCPPC
 PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
 WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

35 FD6-hlgG2 (FD6 subrayado, IgG2 humana en negrita), que incluye las regiones CH2, CH3 y bisagras de IgG2 humana, y el dominio d1 de SIRPα FD6 de alta afinidad:

40 (SEQ ID NO:42)
EEEEVQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGFPRVTTISE
TTRRENMDFSISISNITPADAGTYCYIKFRKGGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPSAAAVECPCPPA
 PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPREE
 QFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

CV1-hlgG2 (CV-1 subrayado, IgG2 humana en negrita), que incluye las regiones CH2, CH3 y bisagras de IgG2

humana, y el dominio d1 de SIRPα CV-1 de alta afinidad:

(SEQ ID NO:43)
EEELQIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGGPFPRVTTVS
DTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAAAVECPPC
 PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPR
 EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

fusiones GCN4 de cremallera de leucina:

Cremallera FD6 (FD6 subrayado, cremallera de leucina GCN4 en negrita), que incluye el dominio d1 de FD6 fusionado a GCN4 y que utiliza la función de cremallera de leucina para dimerizar:

10

(SEQ ID NO:44)
EEEVQIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGGPFPRVTTISE
TTRRENMDFSISISNITPADAGTYCYIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPSAAARMKQLEDK
VEELLSKNYHLENEVARLKKLVGAASGAD

Construcciones de concatámero:

15

Concatámero FD6 (FD6 subrayado, enlazador GGGSGGGGS, FD6 subrayado)

(SEQ ID NO:45)
EEEVQIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGGPFPRVTTISE
TTRRENMDFSISISNITPADAGTYCYIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPSGGGGSGGGGS
EEEVQIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGGPFPRVTTISE
TTRRENMDFSISISNITPADAGTYCYIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS

20

Tabla de secuencias seleccionadas

SEQ ID NO:1	Secuencia nativa, dominio d1	Proteína de 118 aa
SEQ ID NO:2	Secuencia nativa, proteína de longitud completa	Proteína de 504 aa
SEQ ID NO:3	Dominio d1 mutante 1D4	Proteína de 118 aa
SEQ ID NO:4	Dominio d1 mutante 1A5	Proteína de 118 aa
SEQ ID NO:5	Dominio d1 mutante 2D3	Proteína de 118 aa
SEQ ID NO:6	Dominio d1 mutante 2A10	Proteína de 118 aa
SEQ ID NO:7	Dominio d1 mutante 2B5	Proteína de 118 aa
SEQ ID NO:8	Dominio d1 mutante 2A2	Proteína de 118 aa
SEQ ID NO:9	Dominio d1 mutante 2F5	Proteína de 118 aa
SEQ ID NO:10	Dominio d1 mutante CV1	Proteína de 119 aa
SEQ ID NO:37	Dominio d1 mutante FB3	Proteína de 118 aa
SEQ ID NO:38	Dominio d1 mutante FD6	Proteína de 118 aa
SEQ ID NO:39	Dominio d1 mutante FA4	Proteína de 118 aa
SEQ ID NO:40	FD6-hlgG4	Proteína de 345 aa
SEQ ID NO:41	CV1-hlgG4	Proteína de 346 aa
SEQ ID NO:42	FD6-hlgG2	Proteína de 344 aa
SEQ ID NO:43	CV1-hlgG2	Proteína de 345 aa
SEQ ID NO:44	Cremallera de leucina GCN4	Proteína de 158 aa
SEQ ID NO:45	Concatámero FD6	Proteína de 246 aa

LISTADO DE SECUENCIAS

<120> Reactivos SIRP-Alpha de alta afinidad

<130> 006994040

5

<140> EP 13738232.1

<141> 17/01/2013

<150> PCT/US2013/021937

10

<151> 17/01/2013

<150> US 61/587.247

<151> 17/01/2012

15

<160> 45

<170> FastSEQ para Windows, Versión 4.0

<210> 1

20

<211> 118

<212> PRT

<213> H. sapiens

<400> 1

25

```

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

<210> 2

30

<211> 504

<212> PRT

<213> H. sapiens

<400> 2

35

```

Met Glu Pro Ala Gly Pro Ala Pro Gly Arg Leu Gly Pro Leu Leu Cys
 1      5      10      15
Leu Leu Leu Ala Ala Ser Cys Ala Trp Ser Gly Val Ala Gly Glu Glu
      20      25      30
Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala Ala Gly
      35      40      45
Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro Val Gly
      50      55      60
Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu Ile Tyr
      65      70      75      80
Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser Asp Leu
    
```

				85					90				95		
Thr	Lys	Arg	Asn	Asn	Met	Asp	Phe	Ser	Ile	Arg	Ile	Gly	Asn	Ile	Thr
			100					105					110		
Pro	Ala	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Val	Lys	Phe	Arg	Lys	Gly	Ser
		115					120					125			
Pro	Asp	Asp	Val	Glu	Phe	Lys	Ser	Gly	Ala	Gly	Thr	Glu	Leu	Ser	Val
	130					135					140				
Arg	Ala	Lys	Pro	Ser	Ala	Pro	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Ala	Ala	Arg	Ala
145					150					155					160
Thr	Pro	Gln	His	Thr	Val	Ser	Phe	Thr	Cys	Glu	Ser	His	Gly	Phe	Ser
			165						170					175	
Pro	Arg	Asp	Ile	Thr	Leu	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Ser
		180						185				190			
Asp	Phe	Gln	Thr	Asn	Val	Asp	Pro	Val	Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Tyr	Ser
		195					200					205			
Ile	His	Ser	Thr	Ala	Lys	Val	Val	Leu	Thr	Arg	Glu	Asp	Val	His	Ser
	210					215					220				
Gln	Val	Ile	Cys	Glu	Val	Ala	His	Val	Thr	Leu	Gln	Gly	Asp	Pro	Leu
225					230					235					240
Arg	Gly	Thr	Ala	Asn	Leu	Ser	Glu	Thr	Ile	Arg	Val	Pro	Pro	Thr	Leu
				245					250					255	
Glu	Val	Thr	Gln	Gln	Pro	Val	Arg	Ala	Glu	Asn	Gln	Val	Asn	Val	Thr
			260					265					270		
Cys	Gln	Val	Arg	Lys	Phe	Tyr	Pro	Gln	Arg	Leu	Gln	Leu	Thr	Trp	Leu
		275					280					285			
Glu	Asn	Gly	Asn	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	Thr	Ala	Ser	Thr	Val	Thr	Glu
	290					295					300				
Asn	Lys	Asp	Gly	Thr	Tyr	Asn	Trp	Met	Ser	Trp	Leu	Leu	Val	Asn	Val
305					310					315					320
Ser	Ala	His	Arg	Asp	Asp	Val	Lys	Leu	Thr	Cys	Gln	Val	Glu	His	Asp
			325						330					335	
Gly	Gln	Pro	Ala	Val	Ser	Lys	Ser	His	Asp	Leu	Lys	Val	Ser	Ala	His
			340					345						350	
Pro	Lys	Glu	Gln	Gly	Ser	Asn	Thr	Ala	Ala	Glu	Asn	Thr	Gly	Ser	Asn
		355					360					365			
Glu	Arg	Asn	Ile	Tyr	Ile	Val	Val	Gly	Val	Val	Cys	Thr	Leu	Leu	Val
	370					375					380				
Ala	Leu	Leu	Met	Ala	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Arg	Ile	Arg	Gln	Lys	Lys
385					390					395					400
Ala	Gln	Gly	Ser	Thr	Ser	Ser	Thr	Arg	Leu	His	Glu	Pro	Glu	Lys	Asn
			405						410					415	
Ala	Arg	Glu	Ile	Thr	Gln	Asp	Thr	Asn	Asp	Ile	Thr	Tyr	Ala	Asp	Leu
			420					425					430		
Asn	Leu	Pro	Lys	Gly	Lys	Lys	Pro	Ala	Pro	Gln	Ala	Ala	Glu	Pro	Asn
		435					440						445		
Asn	His	Thr	Glu	Tyr	Ala	Ser	Ile	Gln	Thr	Ser	Pro	Gln	Pro	Ala	Ser
	450					455					460				
Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Tyr	Ala	Asp	Leu	Asp	Met	Val	His	Leu	Asn	Arg
465					470					475					480
Thr	Pro	Lys	Gln	Pro	Ala	Pro	Lys	Pro	Glu	Pro	Ser	Phe	Ser	Glu	Tyr
			485						490					495	
Ala	Ser	Val	Gln	Val	Pro	Arg	Lys								
			500												

<210> 3
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

5

<400> 3

ES 2 816 647 T3

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

5 <210> 4
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

10 <400> 4

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

15 <210> 5
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

<400> 5

ES 2 816 647 T3

```

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

```

<210> 6
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

5

<400> 6

```

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

```

10

<210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

15

<400> 7

ES 2 816 647 T3

```

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

```

<210> 8
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

5

<400> 8

```

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

```

10

<210> 9
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

15

<400> 9

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

5 <210> 10
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

<400> 10

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

10

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <210> 11
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

20 <400> 11
 gaggaggagc tgcaggatgac tcagcctgac aagtcctgat cagttgcagc t 51

25 <210> 12
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

<400> 12
 ggtcacagtg cagtcagaaa tggccgactc tccagctgca actgatacgg a 51

30 <210> 13
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 816 647 T3

<222> 22, 25, 29, 31, 38
 <223> n = A, T, C o G

5 <400> 13
 ctgcactgca ctgtgaccrs tntnttnt ntrstcnta tccagtggtt cagagga 57

10 <210> 14
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

15 <400> 14
 attgtagatt aattcccggg ctggtccagc tcctctgaac cactggat 48

20 <210> 15
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

25 <400> 15
 cgggaattaa tctacaatsa wargsawggc cacttcccc gggaacaac tgttcagag 60

30 <210> 16
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 21
 <223> n = A, T, C o G

40 <400> 16
 gttactgatg ctgatggaaa ngtcctatggt ttccytcyta syasyctctg aaacagttgt 60
 tac 63

45 <210> 17
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

50 <400> 17
 tccatcagca tcagtaacat caccacagca gatgccggca cctactactg tgtg 54

55 <210> 18
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 32, 41
 <223> n = A, T, C o G

65 <400> 18
 tcagactta aactccgtwt yaggasyasy cntccggaac ntcacacagt agtaggtgcc 60

<210> 19
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

<400> 19
 acggagtta agtctggagc aggcactgag ctgtctgtgc gtgccaacc ctct 54

ES 2 816 647 T3

<210> 20
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 16, 22
 <223> n = A, T, C o G
 10
 <400> 20
ggatccgagg aggagnttca gnttattcag cctgacaagt ccgtatcagt tgcagctgga 60
gag 63
 15
 <210> 21
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 27
 <223> n = A, T, C o G
 25
 <400> 21
gggccccaca gggatcaggg aggtaanagt gcagtgcaga atggccgact ctccagctgc 60
aac 63
 30
 <210> 22
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 19, 28
 <223> n = A, T, C o G
 <4> 22
 ctgatccctg tggggccnt tcaaggntt agaggagctg gaccagcccg ggaa 54
 40
 <210> 23
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 21, 24, 27
 <223> n = A, T, C o G
 50
 <400> 23
 gtggccttct tttgattaa naanaantc ccgggctggt ccagc 45
 55
 <210> 24
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 19, 28
 <223> n = A, T, C o G
 <400> 24

ES 2 816 647 T3

```

          aatcaaaaag aaggccacnt tccccggntt acaactgttt cagagtccac aaagagagaa 60
          aac 63

5      <210> 25
      <211> 66
      <212> ADN
      <213> H. sapiens

      <220>
10     <221> misc_feature
      <222> 36, 42, 48
      <223> n = A, T, C o G

      <400> 25

15     gccggcatct gctggggtga tgttactgat gctaanggae angtcaangt tttctctctt 60
          tgtgga 66

      <210> 26
      <211> 63
      <212> ADN
      <213> H. sapiens

      <220>
25     <221> misc_feature
      <222> 31, 37
      <223> n = A, T, C o G

      <400> 26

      accccagcag atgccggcac ctactactgt nttaagnttc ggaaagggag ccctgacacg 60
          gag 63

30

      <210> 27
      <211> 66
      <212> ADN
      <213> H. sapiens

      <220>
40     <221> misc_feature
      <222> 48
      <223> n = A, T, C o G

      <400> 27

          agagggtttg gcacgcacag acagctcagt gcctgctcca gacttaanct ccgtgtcagg 60
          gctccc 66

45

      <210> 28
      <211> 47
      <212> ADN
      <213> H. sapiens

50     <220>
      <221> misc_feature
      <222> 16, 22
      <223> n = A, T, C o G

55     <400> 28
          ggatccgagg aggagnttca gnttattcag cctgacaagt ccgtatc 47

60     <210> 29
      <211> 58
      <212> ADN
      <213> H. sapiens

```

ES 2 816 647 T3

<400> 29
 gtgcagtgca gaatggccga ctctccagct gcaactgata cggactgtc aggctgaa 58

5 <210> 30
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 17
 <223> n = A, T, C o G

15 <400> 30
 cattctgcac tgcactntta cctccctgwy tctgtgggg cccatccag 49

20 <210> 31
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

25 <400> 31
 cgggctggtc cagctcctct gaaccactgg atgggcccga cagg 44

30 <210> 32
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 46
 <223> n = A, T, C o G

<400> 32
 gagctggacc agcccggswa ttaatctaca atcaaargsa kggccntttc ccccgggtaa 60
 caactgtttc agag 74

40 <210> 33
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

45 <400> 33
 gaaaagtcca tgtttctct cyttgtasyc tctgaaacag ttgttac 47

50 <210> 34
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

55 <400> 34
 agagaaaaca tggactttc catcagcatc agtaacatca ccccagcaga tgccggcac 59

60 <210> 35
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 27, 33
 <223> n = A, T, C o G

ES 2 816 647 T3

<400> 35
ctccgtgtca gggctccctt tccgaanctt aanacagtag taggtgccgg catctgctg 59

5 <210> 36
<211> 64
<212> ADN
<213> H. sapiens

10 <220>
<221> misc_feature
<222> 17
<223> n = A, T, C o G

15 <400> 36
gagccctgac acggagntta agtctgggagc aggcactgag ctgtctgtgc gtgccaaacc 60
ctct 64

20 <210> 37
<211> 118
<212> PRT
<213> H. sapiens

<400> 37

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

25 115

30 <210> 38
<211> 118
<212> PRT
<213> H. sapiens

<400> 38

ES 2 816 647 T3

```

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

```

<210> 39
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

5

<400> 39

```

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

```

10

<210> 40
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

15

<400> 40

```

Glu Glu Glu Val Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala
 1          5          10          15
Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
      20          25          30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Val Leu
      35          40          45

```

```

Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Ile Ser
 50                               55                               60
Glu Thr Thr Arg Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn
 65                               70                               75                               80
Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
 85                               90                               95
Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser
 100                              105                              110
Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Ala Ala Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 115                              120                              125
Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 130                              135                              140
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 145                              150                              155                              160
Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 165                              170                              175
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 180                              185                              190
Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 195                              200                              205
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 210                              215                              220
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 225                              230                              235                              240
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 245                              250                              255
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 260                              265                              270
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 275                              280                              285
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 290                              295                              300
Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 305                              310                              315                              320
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 325                              330                              335
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340                              345

```

<210> 41
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

5

<400> 41

ES 2 816 647 T3

Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
 20 25 30
 Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Val Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
 50 55 60
 Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn
 65 70 75 80
 Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
 85 90 95
 Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
 100 105 110
 Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Ala Ala Pro Pro Cys Pro Pro Cys
 115 120 125
 Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 130 135 140
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 145 150 155 160
 Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 165 170 175
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 180 185 190
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 195 200 205
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 210 215 220
 Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 225 230 235 240
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 245 250 255
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 260 265 270
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 275 280 285
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 290 295 300
 Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 305 310 315 320
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 325 330 335
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340 345

5 <210> 42
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

10 <400> 42

Glu Glu Glu Val Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
 20 25 30
 Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Val Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Ile Ser
 50 55 60
 Glu Thr Thr Arg Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn
 65 70 75 80
 Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
 85 90 95
 Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser
 100 105 110
 Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Ala Ala Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 115 120 125
 Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 130 135 140
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 145 150 155 160
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 165 170 175
 Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 180 185 190
 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
 195 200 205
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 210 215 220
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 225 230 235 240
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 245 250 255
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 260 265 270
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 275 280 285
 Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 290 295 300
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 305 310 315 320
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 325 330 335
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 43
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

<400> 43

5

10

ES 2 816 647 T3

Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
 20 25 30
 Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Val Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
 50 55 60
 Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn
 65 70 75 80
 Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
 85 90 95
 Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
 100 105 110
 Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Ala Ala Val Glu Cys Pro Pro Cys
 115 120 125
 Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 130 135 140
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 145 150 155 160
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 165 170 175
 Val Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 180 185 190
 Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 195 200 205
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 210 215 220
 Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 225 230 235 240
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 245 250 255
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 260 265 270
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 275 280 285
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 290 295 300
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 305 310 315 320
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 325 330 335
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340 345

<210> 44
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

<400> 44

5

10

ES 2 816 647 T3

Glu Glu Glu Val Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
 20 25 30
 Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Val Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Ile Ser
 50 55 60
 Glu Thr Thr Arg Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn
 65 70 75 80
 Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
 85 90 95
 Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser
 100 105 110
 Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Ala Ala Arg Met Lys Gln Leu Glu Asp
 115 120 125
 Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His Leu Glu Asn Glu Val
 130 135 140
 Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly Ala Ala Ser Gly Ala Asp
 145 150 155

<210> 45
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> H. sapiens

5

<400> 45

Glu Glu Glu Val Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
 20 25 30
 Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Val Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Ile Ser
 50 55 60
 Glu Thr Thr Arg Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn
 65 70 75 80
 Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
 85 90 95
 Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser
 100 105 110
 Val Arg Ala Lys Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Glu Glu Glu Val Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala
 130 135 140
 Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
 145 150 155 160
 Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Val Leu
 165 170 175

10

Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Ile Ser
 180 185 190
 Glu Thr Thr Arg Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn
 195 200 205
 Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
 210 215 220
 Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser
 225 230 235 240
 Val Arg Ala Lys Pro Ser
 245

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido SIRP α de alta afinidad que comprende al menos una y no más de 15 modificaciones de aminoácidos dentro del dominio d1 de una secuencia SIRP α de tipo silvestre humana, en donde las modificaciones se hacen a los restos correspondientes a los restos seleccionados del grupo que consiste en: L4, V6, A21, V27, I31, E47, K53, E54, H56, V63, S66, K68, V92, F94 y F103 de SEQ ID NO:1, en donde la modificación de aminoácidos aumenta la afinidad del polipéptido SIRP α que se une a CD47 con respecto a la afinidad del polipéptido SIRP α humano de tipo silvestre y en donde el polipéptido SIRP α de alta afinidad carece de un dominio transmembrana SIRP α .
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido SIRP α de alta afinidad tiene K_D de al menos 1×10^{-9} M para CD47.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido SIRP α de alta afinidad tiene K_D de al menos 1×10^{-8} M para CD47.
4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde;
- (i) el polipéptido consiste en todo o una parte del dominio d1 de SIRP α o
- (ii) el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos de SIRP α fuera del dominio d1.
5. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende al menos una modificación de aminoácidos seleccionada de (1) L4V; L4I (2) V6I; V6L; (3) A21V; (4) V27I; V27L; (5) I31T; I31S; I31F; (6) E47V; E47L; (7) K53R; (8) E54Q; (9) H56P; H56R; (10) S66T; S66G; (11) K68R; (12) V92I; (13) F94L; F94V; (14) V63I; y (15) F103V.
6. El polipéptido de la reivindicación 5, que comprende modificaciones de aminoácidos seleccionadas de:
- i. V6I; V27I; I31 F; E47V; K53R; E54Q; H56P; S66T; y V92I;
- ii. V27I o V27L; K53R; S66T o S66G; K68R; y F103V;
- iii. L4V o L4I; V27I o V27L; E47V o E47L; K53R; E54Q; S66T o S66G; K68R; V92I; y F103V
- iv. L4V o L4I; V6I o V6L; A21V; V27I o V27L; I31T, I31S o I31 F; E47V o E47L; K53R; H56P o H56R; S66T o S66G; K68R; y F94L o F94V;
- v. V6I o V6L; V27I o V27L; I31T, I31S o I31F; E47V o E47L; K53R; E54Q; H56P o H56R; S66T o S66G; V92I; y F94L o F94V;
- vi. L4V o L4I; A21V; V27I o V27L; I31T, I31S o I31 F; E47V o E47L; K53R; E54Q; H56P o H56R; S66T o S66G; F94L o F94V; y F103V;
- vii. L4V o L4I; V6I o V6L; V27I o V27L; I31T, I31S o I31F; E47V o E47L; K53R; H56P o H56R; S66T o S66G; K68R; V92I; y F94L o F94V;
- viii. L4V o L4I; V6I o V6L; I31T, I31S o I31 F; E47V o E47L; K53R; H56P o H56R; S66T o S66G; V92I; y F103V;
- ix. V6I; V27I; I31 F; E47L; K53R; E54Q; H56P; y S66T;
- x. L4V; V6I; V27I; I31 F; E47V; K53R; E54Q; H56P; V63I; S66T; K68R; y V92I;
- xi. V6I; V27I; I31T; E47V; K53R; E54Q; H56P; S66G; K68R; V92I; y F103V;
- xii. V27I; K53R; S66T; S66G; K68R; F103V;
- xiii. L4V; V27L; E47V; K53R; E54Q; S66G; K68R; V92I;
- xiv. L4V; V6I; A21V; V27I; I31T; E47L; K53R; H56P; S66T; K68R; F94L;
- xv. V6I; V27I; I31S; I31F; E47V; K53R; E54Q; H56P; S66G; V92I; F94L;
- xvi. L4I; A21V; V27I; I31 F; E47V; K53R; E54Q; H56R; S66G; F94V; F103V;
- xvii. L4V; V6I; V27I; I31F; E47V; K53R; H56R; S66G; K68R; V92I; F94L; o
- xviii. L4V; V6L; I31F; E47V; K53R; H56P; S66G; V92I; F103V.
7. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido SIRP α de alta afinidad comprende una secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-6, 8-10 y 37-39.
8. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 10.
9. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, fusionado a una secuencia de inmunoglobulina Fc.
10. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el polipéptido SIRP α de alta afinidad es multimérico.
11. Una formulación terapéutica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
12. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el polipéptido comprende además un marcador detectable.
13. Una formulación de la reivindicación 11 para su uso en un método de tratamiento de un cáncer, comprendiendo el

método poner en contacto una célula que expresa CD47 con la formulación *in vivo*.

14. La formulación para su uso de la reivindicación 13, que comprende además poner en contacto dicha célula con un anticuerpo específico de tumor.

5 15. La formulación para su uso de la reivindicación 13, en donde la célula que expresa CD47 es una célula de cáncer.

10 16. La formulación de la reivindicación 11 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune, comprendiendo el método administrar la formulación en combinación con un anticuerpo terapéutico.

17. Un método *in vitro* de modulación de la fagocitosis de una célula que expresa CD47, que comprende poner en contacto dicha célula con una formulación de la reivindicación 11 *in vitro*.

15 18. El polipéptido de la reivindicación 12 para su uso en un método de formación de imágenes de un tumor, comprendiendo el método poner en contacto células cancerosas con el polipéptido.

20 19. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el polipéptido SIRP α de alta afinidad es monomérico.

20. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde la modificación de aminoácidos aumenta la afinidad del polipéptido SIRP α que se une a CD47 al disminuir la tasa de desactivación en al menos 10 veces.

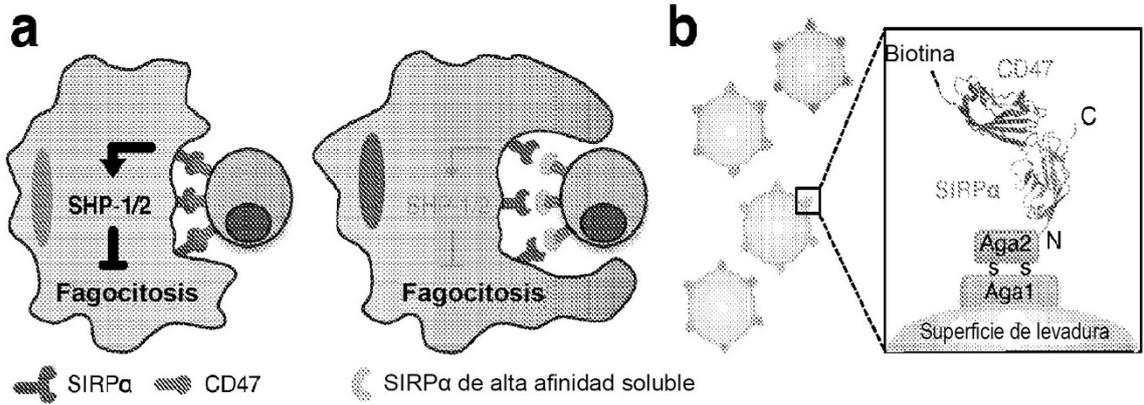
25 21. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde la modificación de aminoácidos aumenta la afinidad del polipéptido SIRP α que se une a CD47 al disminuir la tasa de desactivación en al menos 20 veces.

22. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde la modificación de aminoácidos aumenta la afinidad del polipéptido SIRP α que se une a CD47 al disminuir la tasa de desactivación en al menos 50 veces.

30 23. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde la modificación de aminoácidos aumenta la afinidad del polipéptido SIRP α que se une a CD47 al disminuir la tasa de desactivación en al menos 100 veces.

35 24. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde la modificación de aminoácidos aumenta la afinidad del polipéptido SIRP α que se une a CD47 al disminuir la tasa de desactivación en al menos 500 veces.

25. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el CD47 es CD47 humano.



c

	4	6	21	27	31	47	53	54	56	63	66	68	92	94	103	K_D
alelo 1 TS	L	V	A	V	I	E	K	E	H	V	S	K	V	F	F	279 nM
alelo 2 TS			A								L					452 nM
1D4				I			R				T	R		V		11,6 nM
1A5	V		L		V	R	Q			G	R	I				3,6 nM
2D3	V	V		T	L	R	P			T	R		L			847 pM
2A10				S	V	R	Q	P		G		I	L			500 pM
2B5	I	V		F	V	R	Q	R		G			V	V		423 pM
2A2	V			F	V	R		R		G	R	I	L			402 pM
2F5	V	L		F	V	R		P		G		I	V			276 pM
FB3				F	L	R	Q	P		T						69,9 pM
FD6	V			F	V	R	Q	P	I	T	R	I				41,3 pM
FA4				T	V	R	Q	P		G	R	I	V			34,0 pM
Consenso (CV1)				F	V	R	Q	P		T		I				11,1 pM

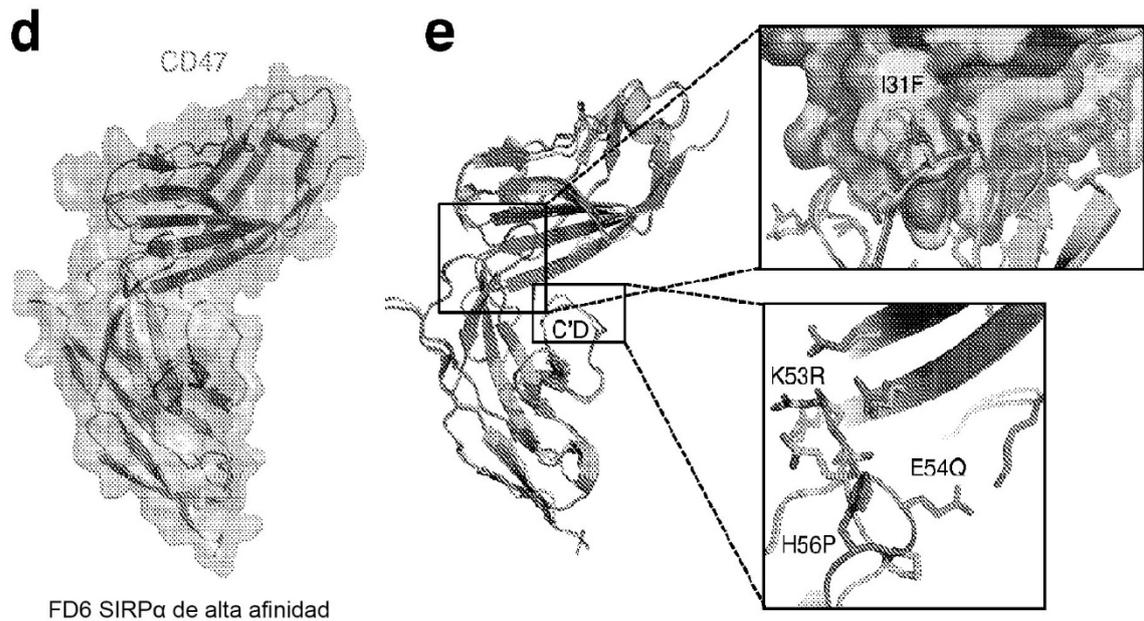
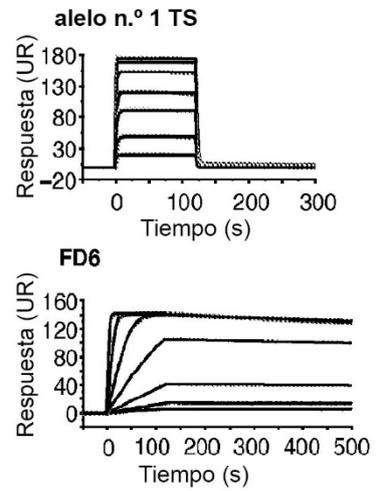


Figura 1

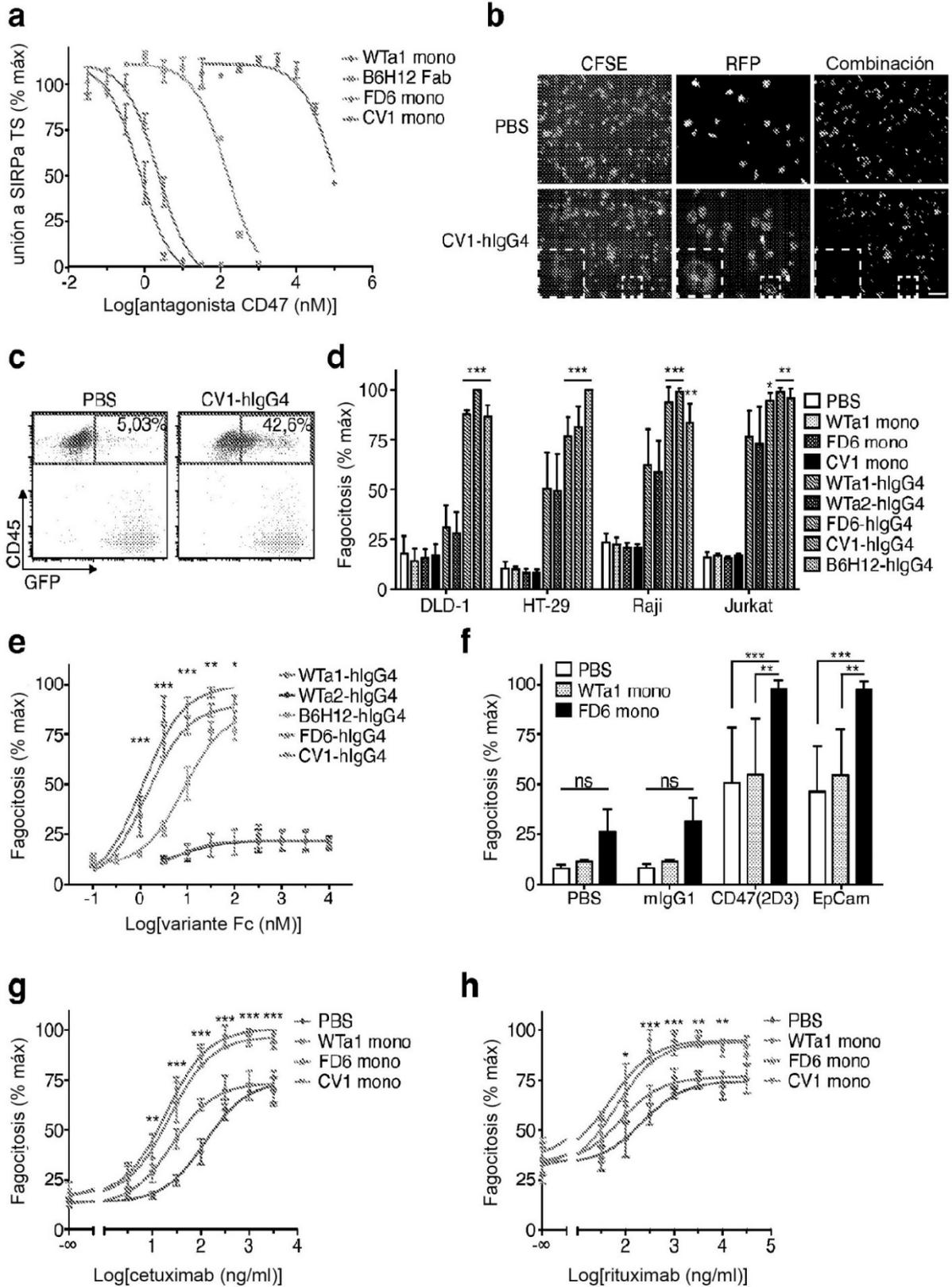


Figura 2

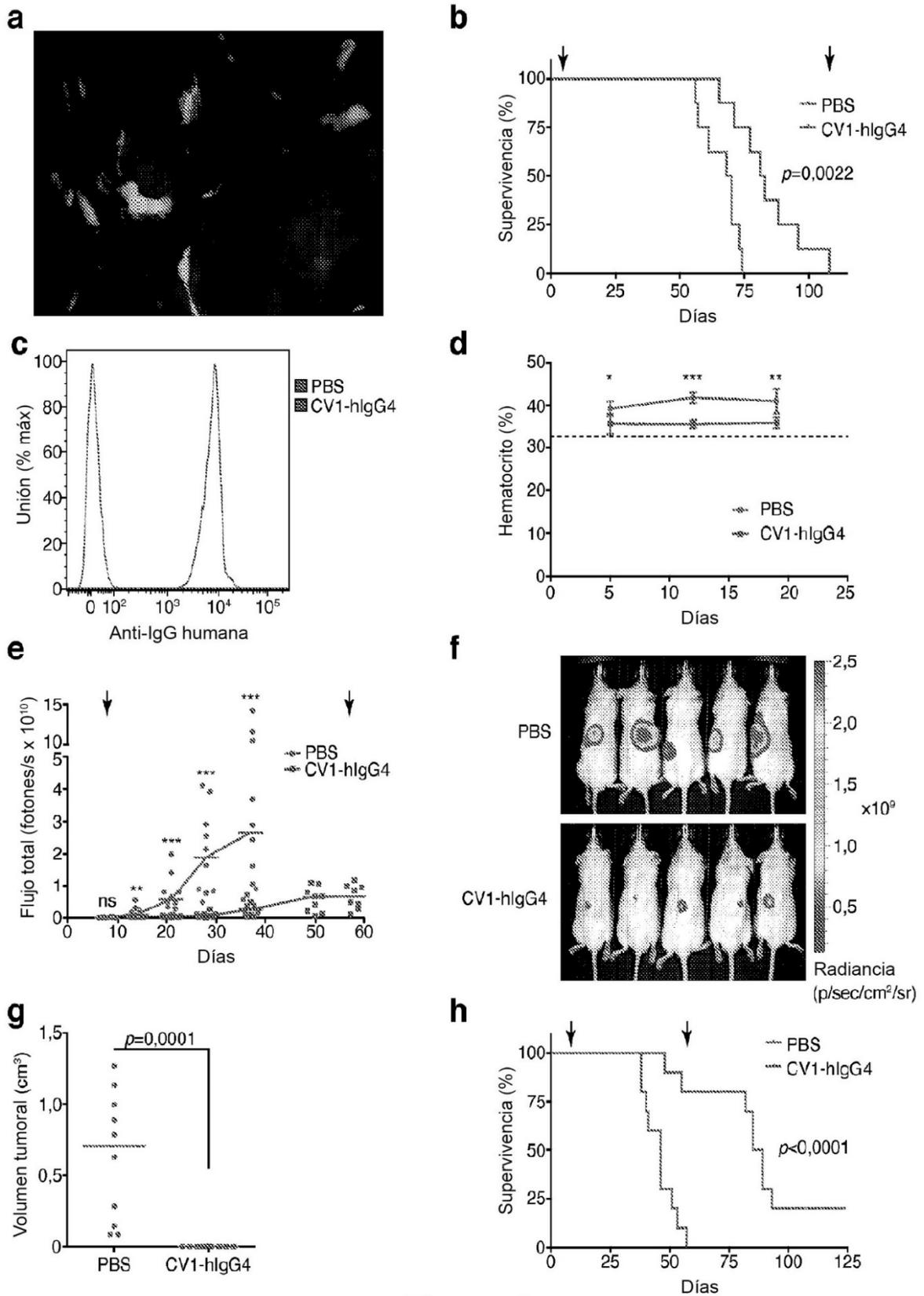


Figura 3

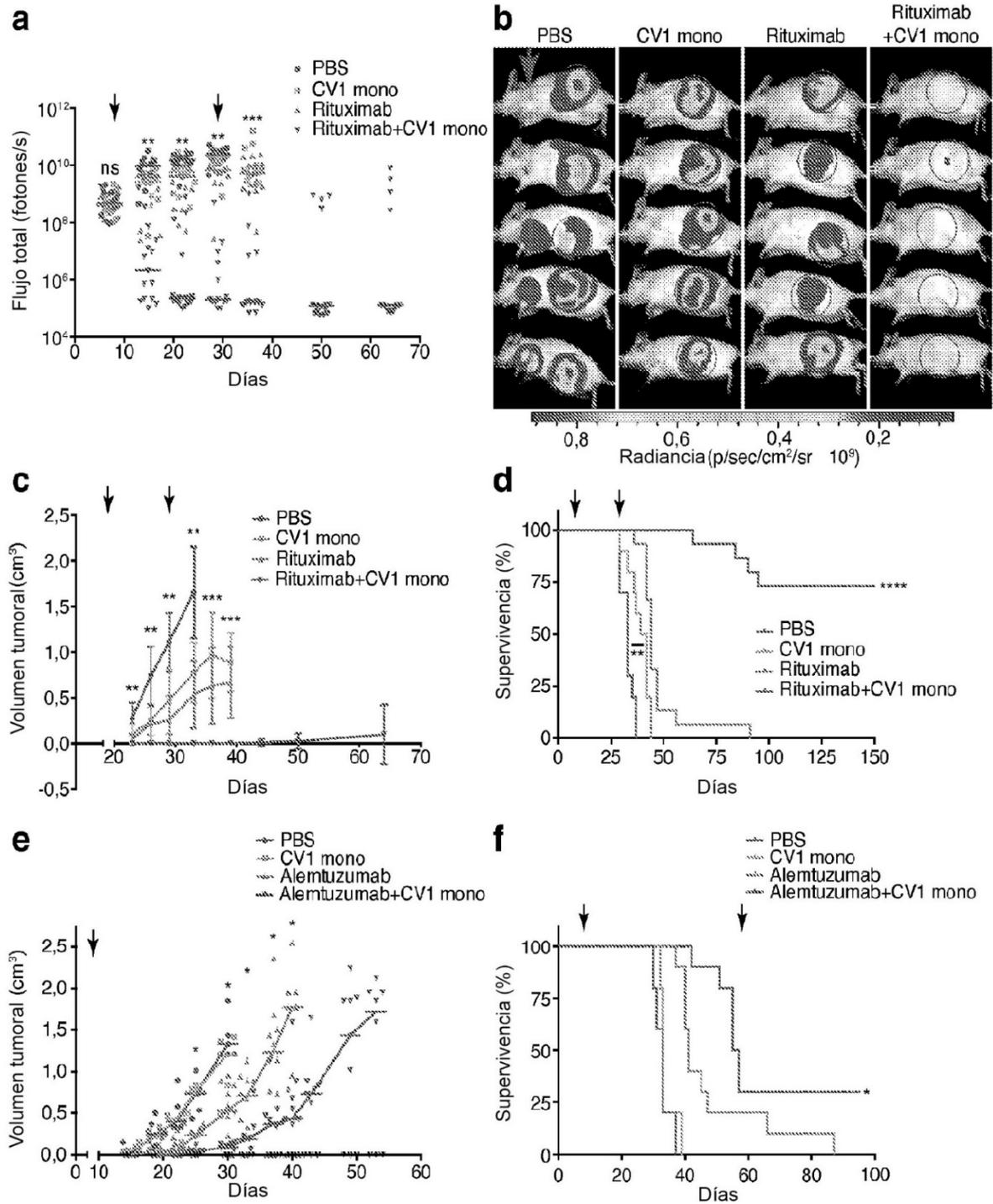


Figura 4

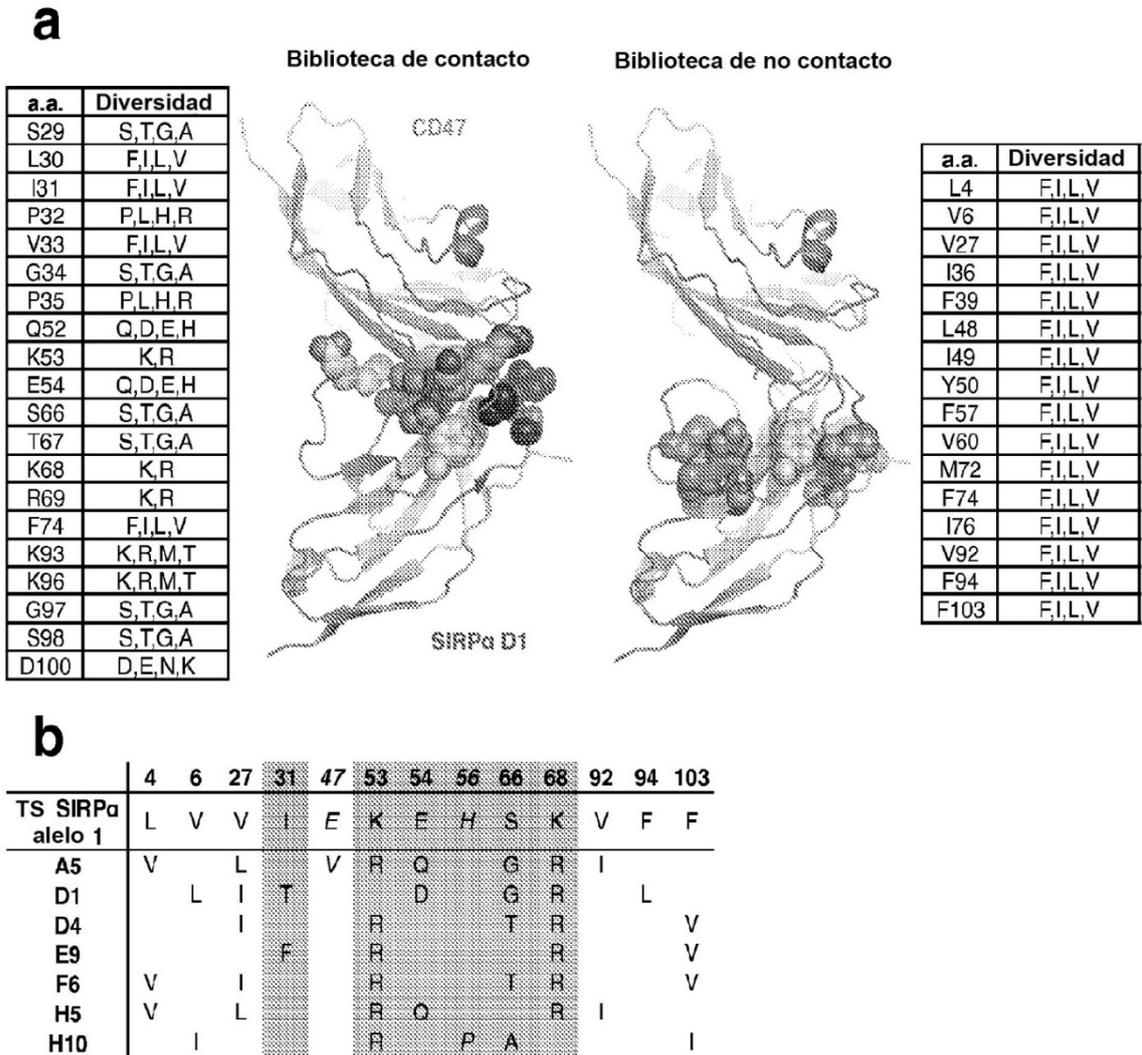


Figura 5

a

a.a.	Diversidad
L4	F,I,L,V
V6	F,I,L,V
V27	F,I,L,V
I31	I,T,F,S
E47	E,V,Q,L
K53	K,R
E54	E,D,Q,H
H56	H,P,L,R
S66	S,G,T,A
K68	K,R
V92	F,I,L,V
F94	F,I,L,V
F103	F,I,L,V



Figura 6

a

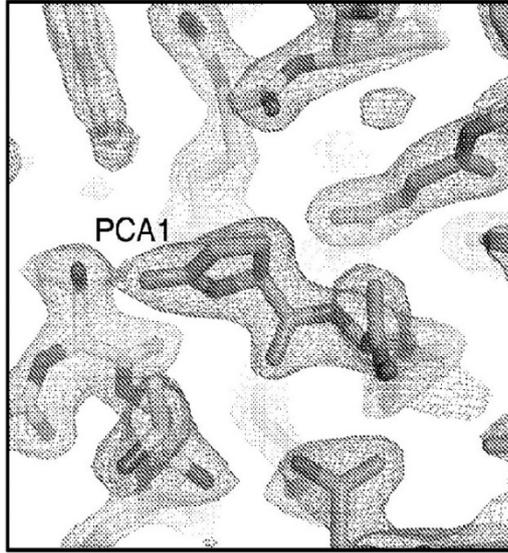


Figura 7

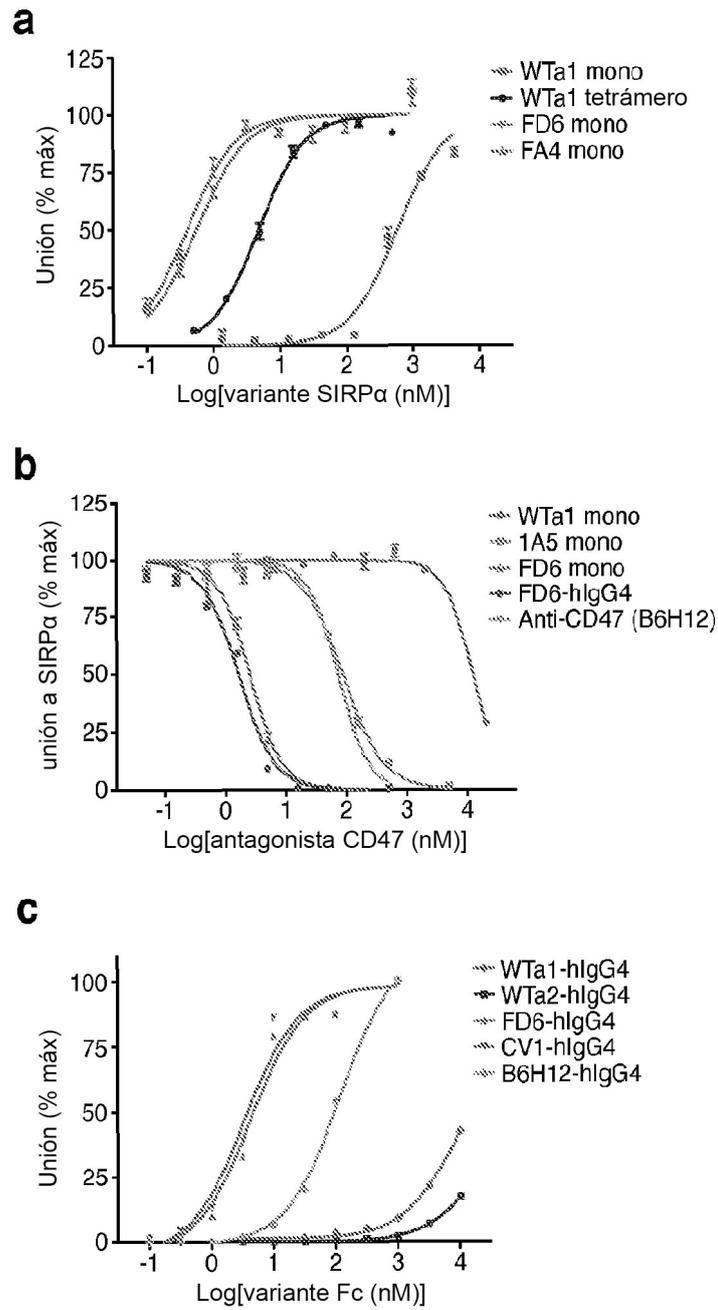


Figura 8

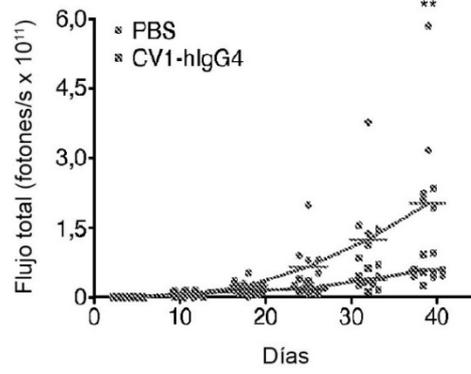
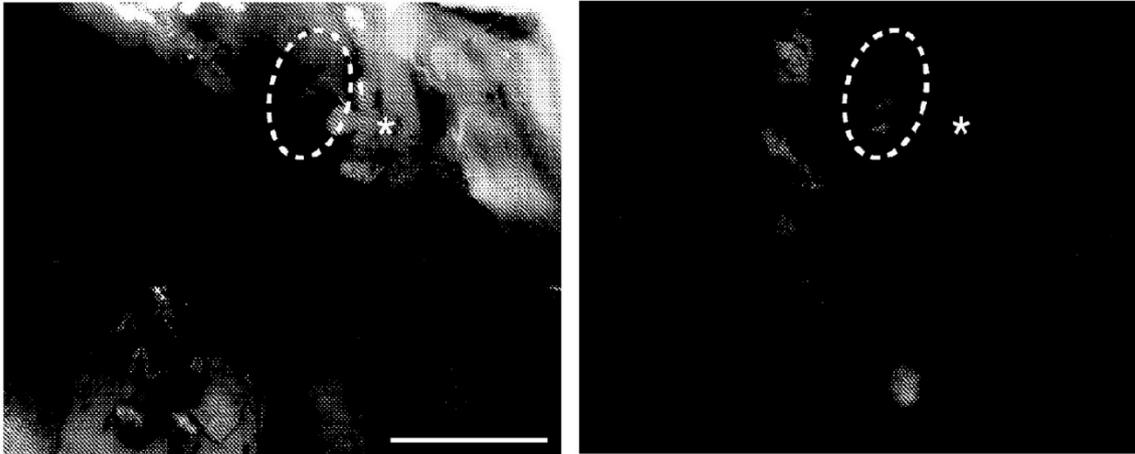
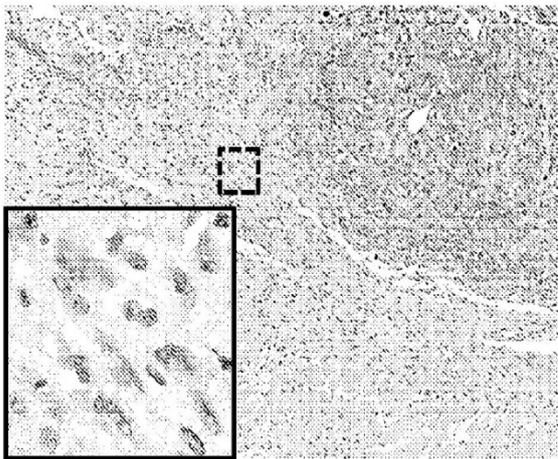


Figura 9

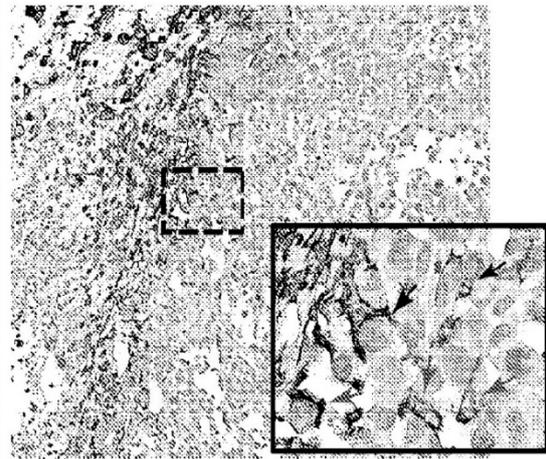
A



B



C



D

	Unidad	Intervalo normal		PBS		CV1-hlgG4		valor p
		Bajo	Alto	Promedio	Desv. est.	Promedio	Desv. est.	
Leucocitos totales	10 ³ /μL	2,60	10,10	6,94	4,84	5,64	2,17	0,599
Linfocitos	10 ³ /μL	1,30	8,40	2,44	1,43	1,14	0,66	0,102
Monocitos	10 ³ /μL	1,10	0,30	0,72	0,48	0,54	0,11	0,440
Granulocitos	10 ³ /μL	0,40	2,00	3,78	3,20	3,96	1,86	0,916
Hematocrito	%	32,80	48,00	37,60	3,80	30,42	2,72	0,009
Volumen corpuscular medio	fL	42,30	55,90	44,42	0,68	45,62	2,39	0,311
Anchura de distribución de eritrocitos	%	0,00	99,90	29,40	0,73	32,78	5,11	0,181
Hemoglobina	g/dL	10,00	16,10	13,50	1,47	11,04	1,04	0,016
Conc. hemoglobina corpuscular media	g/dL	29,50	35,10	35,96	1,15	36,38	0,97	0,551
Eritrocitos totales	10 ⁶ /μL	6,50	10,10	8,46	0,87	6,69	0,79	0,010
Hemoglobina corpuscular media	pg	13,70	18,10	15,96	0,43	16,56	0,66	0,126
Trombocitos	10 ³ /μL	250,00	1540,00	466,80	102,59	389,80	108,09	0,281
Volumen de trombocitos medio	fL	0,00	99,90	5,78	0,49	5,84	0,35	0,829

Figura 10

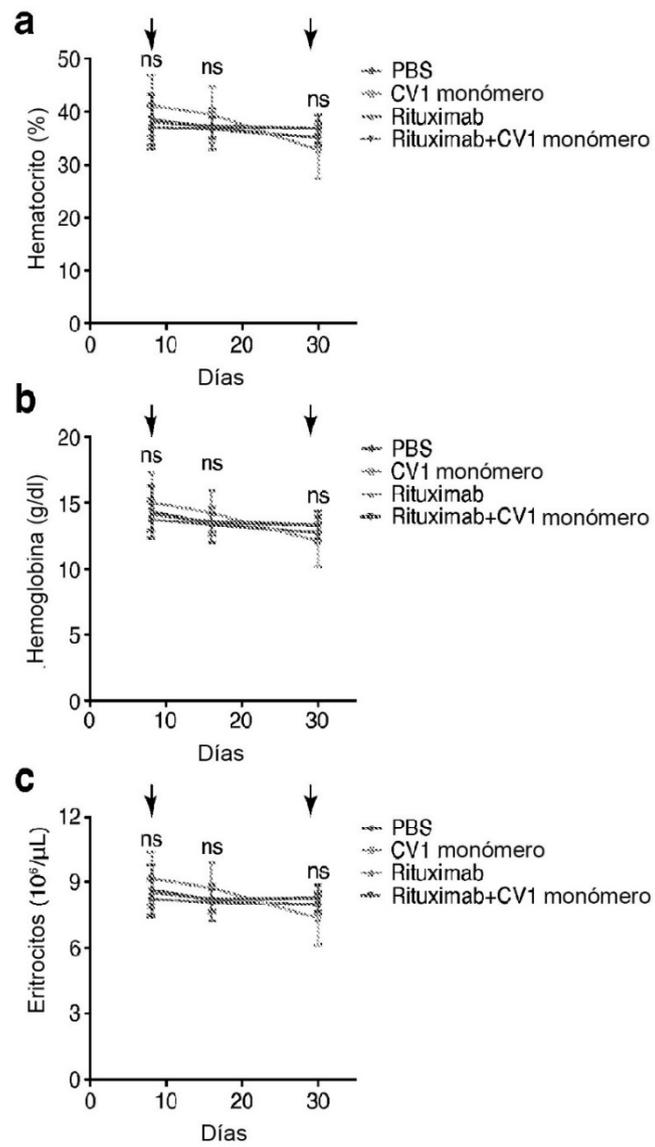


Figura 11

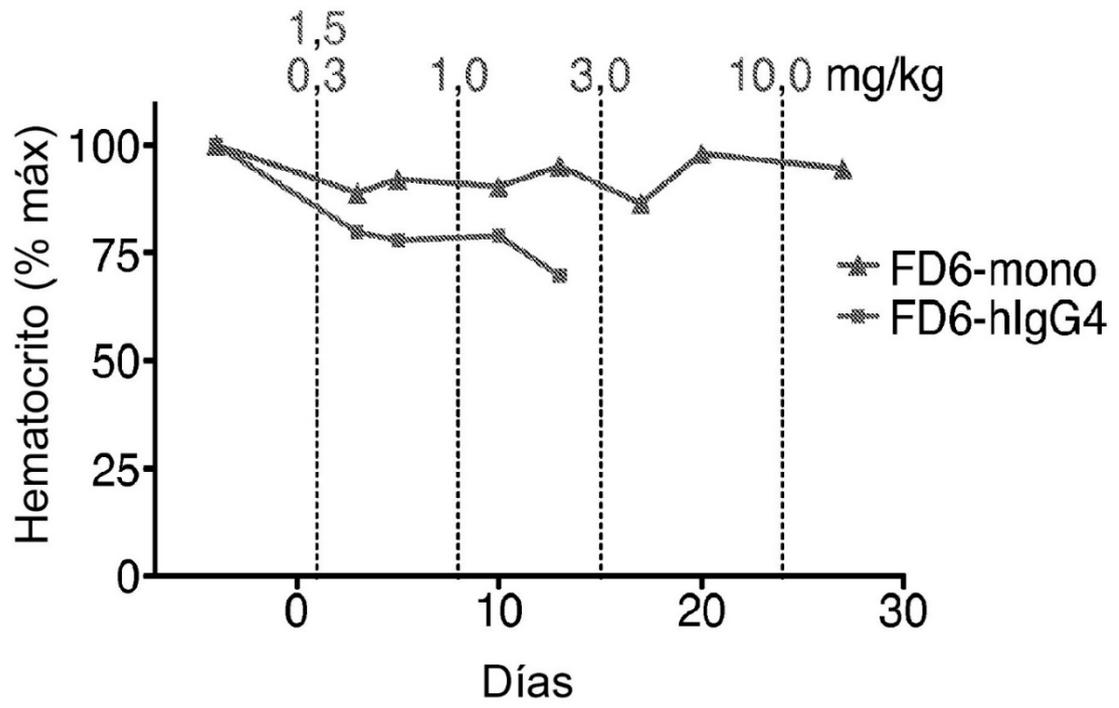
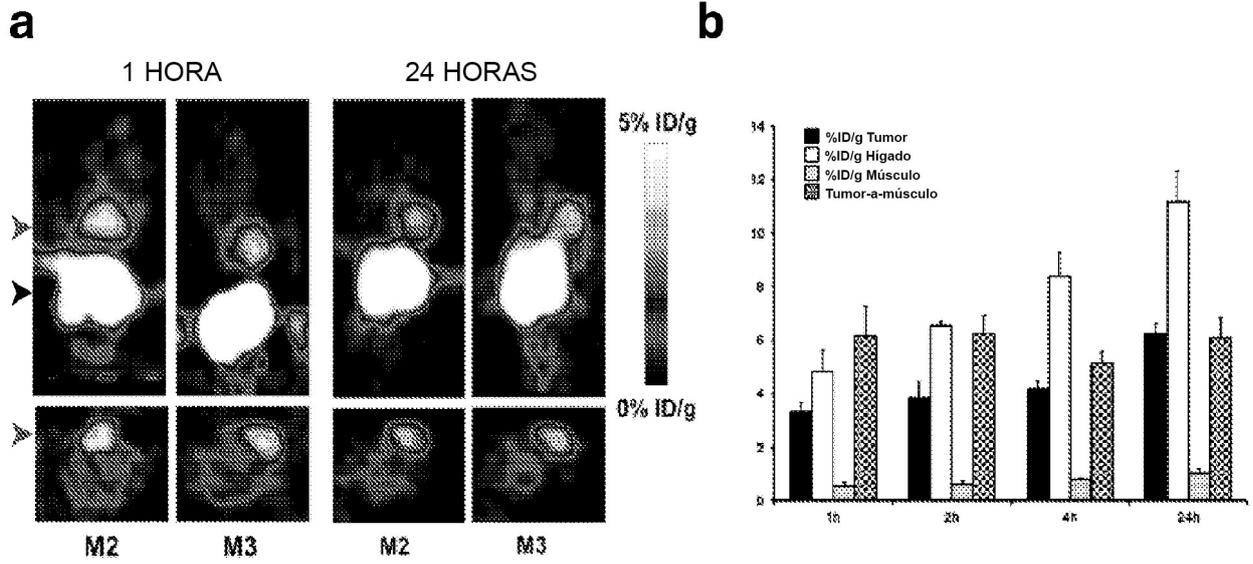


Figura 12



c

Organo	Media $\times 10^3/g\%$	Desv. EST.	T/N	Media	Desv. EST.
Sangre	1,77	0,23	T/Sangre	3,46	0,50
Corazón	2,98	0,63	T/Músculo	7,34	1,02
Hígado	15,61	0,49	T/Hígado	0,39	0,01
Pulmones	7,64	3,35	T/Pulmón	0,81	0,14
Músculo	0,83	0,10	T/Bazo	1,81	0,23
Riñón	132,60	17,67	T/páncreas	2,37	0,01
Bazo	3,53	0,99	T/riñón	0,04	0,01
Cerebro	0,54	0,14			
Intestino	6,86	0,41			
Tumor	6,03	0,24			
Cola	1,23	0,08			
Piel	0,87	0,17			
Estómago	3,87	1,10			
Páncreas	3,24	1,67			
Hueso	1,47	0,38			

Figura 13

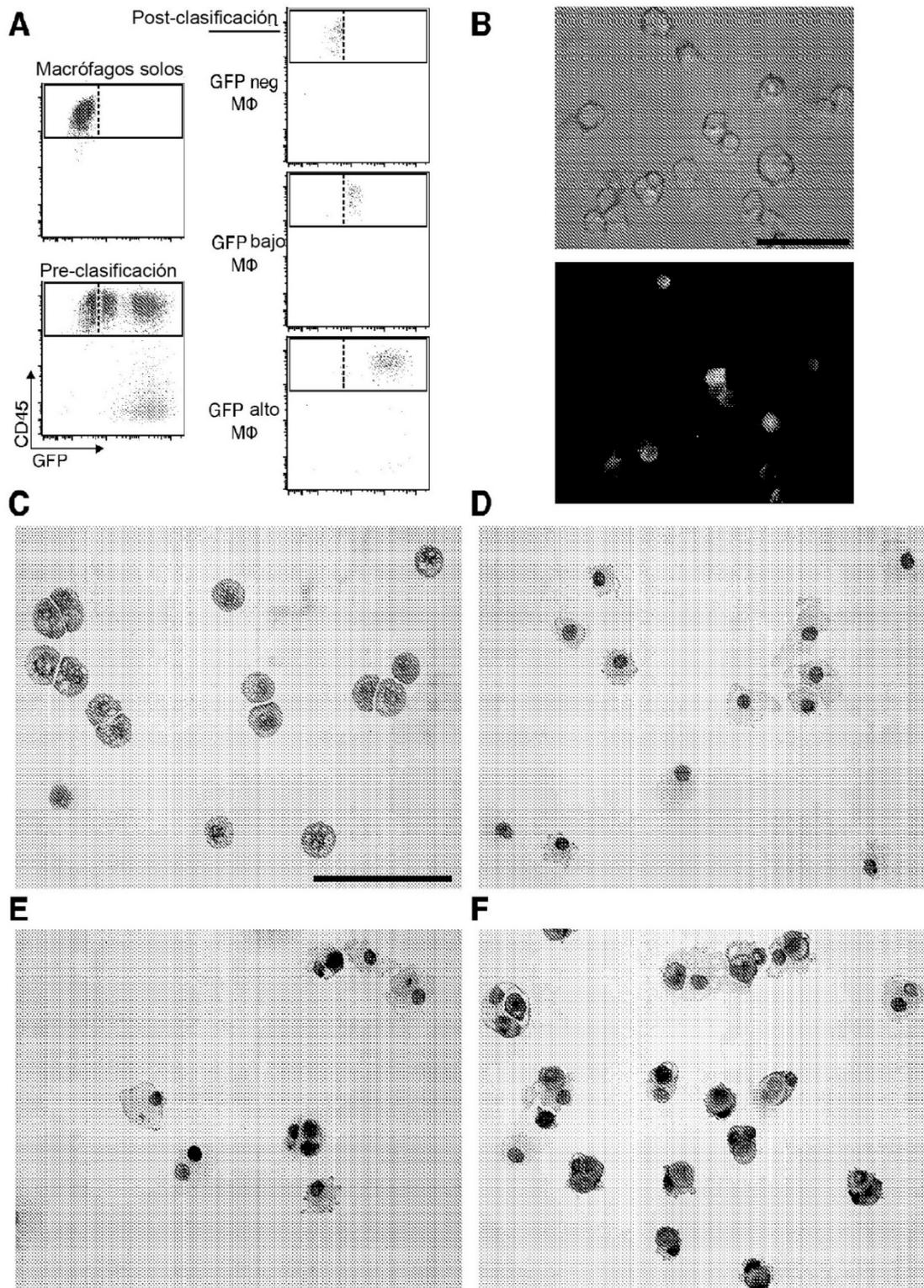


Figura 14

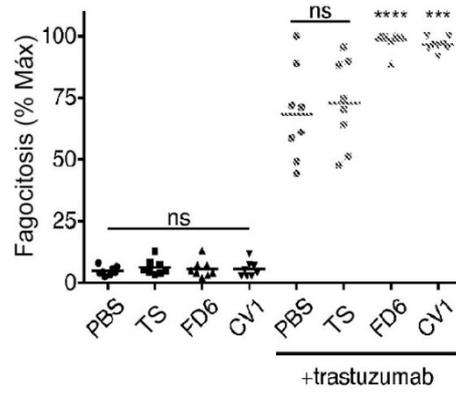


Figura 15

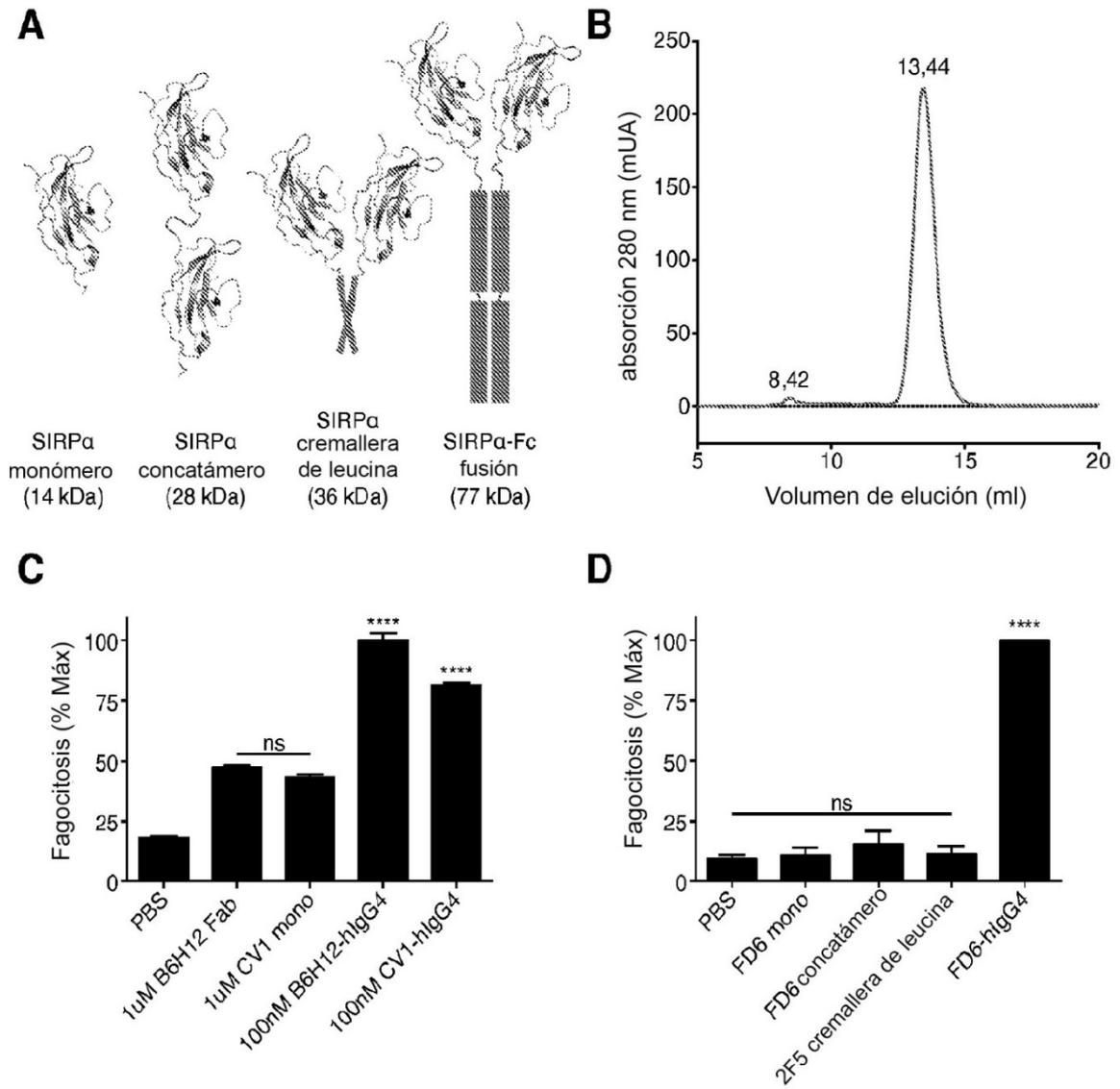


Figura 16

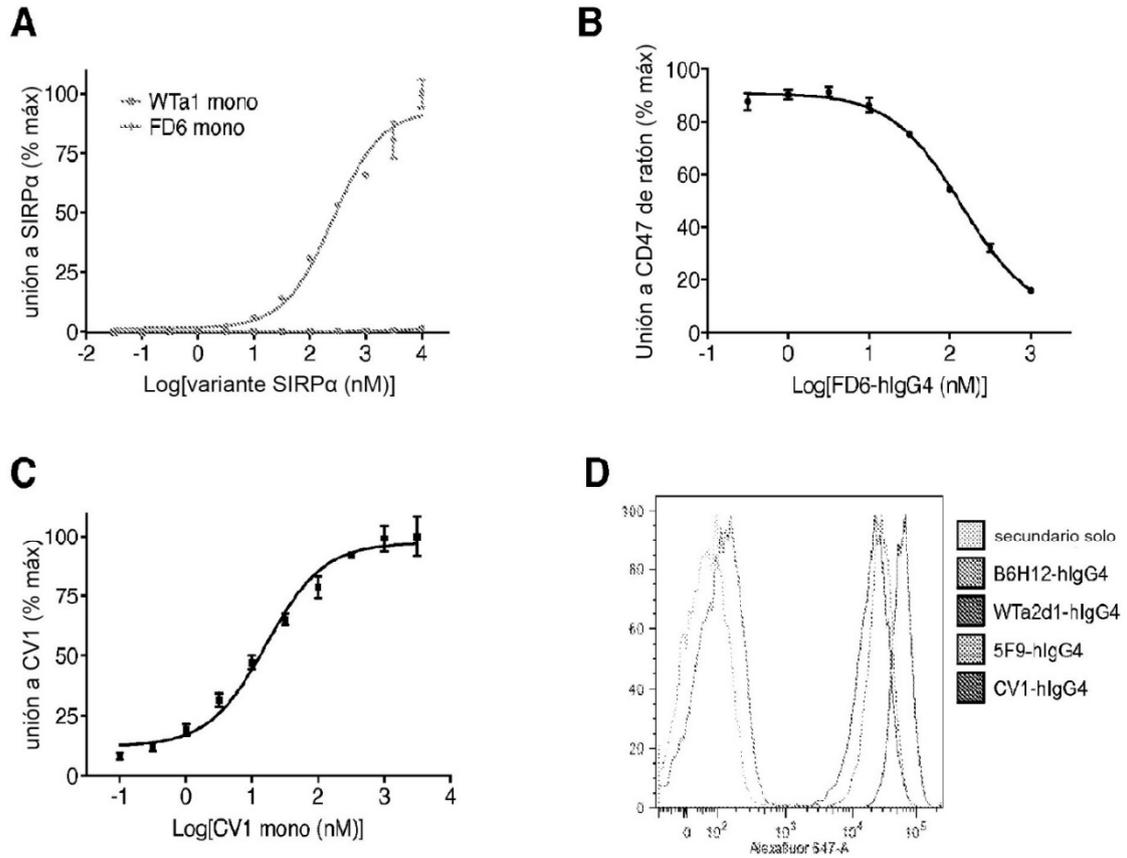


Figura 17