



# OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 817 074

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

**T3** 

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: 21.10.2015 PCT/IB2015/058124

(87) Fecha y número de publicación internacional: 28.04.2016 WO16063233

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 21.10.2015 E 15794641 (9)

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 15.07.2020 EP 3209691

(54) Título: Composiciones para inducir la diferenciación de células supresoras derivadas mieloides para tratar el cáncer y las enfermedades infecciosas

(30) Prioridad:

24.10.2014 EP 14190370

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: **06.04.2021** 

(73) Titular/es:

OSE IMMUNOTHERAPEUTICS (100.0%) 22 Boulevard Benoni Goullin 44200 Nantes, FR

(72) Inventor/es:

POIRIER, NICOLAS y VANHOVE, BERNARD

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge** 

## **DESCRIPCIÓN**

Composiciones para inducir la diferenciación de células supresoras derivadas mieloides para tratar el cáncer y las enfermedades infecciosas

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

La presente invención pertenece al campo de la inmunoterapia. Más específicamente, la presente invención proporciona un método para diferenciar células supresoras derivadas mieloides (MDSC) en células no supresoras, para reducir la inmunodepresión inducida por MDSC y, en consecuencia, permitir respuestas inmunitarias apropiadas en cánceres, enfermedades infecciosas, vacunación, traumatismo, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias crónicas y trasplantes.

Las células supresoras derivadas mieloides (MDSC) son un grupo de células heterogéneas de progenitores de células mieloides hematopoyéticas inmaduras, que ejercen funciones inmunosupresoras y por lo tanto regulan negativamente las respuestas inmunitarias (Gabrilovich y Nagarai, 2009; Talmadge y Gabrilovich, 2013). Se descubrió que las MDSC se acumulan en muchas afecciones patológicas y explotan una plétora de mecanismos redundantes para influir en las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas (Dilek et al., 2010; Gabrilovich et al., 2012). Las MDSC son potentes inhibidores de la activación, la proliferación y las respuestas de los linfocitos T y B, en particular por los mecanismos de agotamiento de nutrientes (por ejemplo, L-arginina y L-cisteína), la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), la perturbación del tráfico de linfocitos T (por ejemplo, disminución de la expresión de L-selectina y liberación aberrante de quimiocinas), la inducción de apoptosis (a través de Galectina 9) y mediante la desviación de la diferenciación de linfocitos T hacia respuestas Th-17 a través de la producción de IL-1β (Bruchard et al., Nat. Med. 2013). Las MDSC también tienen la extraordinaria capacidad de expandir las células T reguladoras naturales (nTreg) específicas de antígeno, promover la conversión de células T vírgenes en células Treg inducidas (iTreg) y promover la infiltración de Treg en sitios inflamados, infectados o tumorales. También se describió que las MDSC disminuyen el número e inhiben la función de las células NK, en particular por TGFβ unido a la membrana. Adicionalmente, en analogía con la desviación inmunitaria que inducen en las respuestas de las células T, MDSC sesga los macrófagos hacia un fenotipo M2 (macrófagos no inflamatorios) al inhibir la producción de IL-12 por macrófagos. De forma similar, MDSC deteriora la función de las células dendríticas (DC) al producir IL-10, que también inhibe la producción de IL-12 por las DC y reduce la capacidad de las DC de activar las células T. Finalmente, las MDSC actúan sobre las células no hematopoyéticas y, en particular, se ha reconocido ampliamente que facilitan la angiogénesis tumoral, la diseminación del tumor, la invasión de células tumorales y la metástasis (Keskinov y Shurin, 2014; Ye et al., 2010).

En condición fisiológica, las células madre hematopoyéticas se diferencian en células progenitoras linfoides comunes (CLP) o progenitoras mieloides comunes (CMP). Estos progenitores después generan los dos tipos distintos de células de nuestro sistema inmunitario: las CLP se diferencian en linfocitos o células citolíticas naturales (NK), mientras que las CMP se diferencian en células mieloides inmaduras (IMC). Normalmente, las IMC migran a diferentes órganos periféricos, donde se diferencian exclusivamente en células dendríticas y macrófagos o células polimorfonucleares (también llamadas granulocitos). Sin embargo, varios factores (por ejemplo, GM-CSF, M-CSF, IL-6, IL-1β, IL-13, S100A8/A9 etc.) producidos en muchas afecciones patológicas, promueven la acumulación de IMC, previniendo su diferenciación e induciendo su activación. Estas células exhiben funciones inmunosupresoras después de la activación y se nombraron MDSC en 2007 (Gabrilovich et al., 2007). Hasta el momento, se han caracterizado fenotípica y funcionalmente tres poblaciones principales de MDSC: MDSC pro-mielocíticas o monocíticas (M-MDSC o Mo-MDSC) y MDSC polimorfonucleares (también llamadas granulocíticas) (PMN-MDSC o G-MDSC). Las Mo-MDSC, caracterizadas por el fenotipo CD11b+ Ly6C+Ly6G- en ratones y el fenotipo CD11b+ CD33+ HLA-DR-/bajo CD14+ en seres humanos, son la población de MDSC inmunosupresoras más potente, funcionan al menos expresando las enzimas nitrito óxido sintasa (iNOS) y arginasa (ARG1), y son abundantes en el microambiente tumoral. Las MDSC pro-mielocíticas se parecen a las Mo-MDSC pero no expresan el marcador CD14, sugiriendo un estado más inmaduro en comparación con Mo-MDSC (Díaz-Montero et al., 2014). Las PMN-MDSC, caracterizadas por el fenotipo CD11b+ Ly6CbajoLy6G+ en ratones y el fenotipo CD11b+ CD33+ HLA-DR- CD15+ en seres humanos, son más predominantes en la periferia y los órganos linfoides y funcionan principalmente produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) (Solito et al., 2014). Aunque las MDSC son precursoras de macrófagos, células dendríticas o granulocitos bloqueados en su diferenciación en algunas afecciones patológicas, todavía tienen el potencial de seguir su camino de diferenciación "normal". De hecho, el cultivo de Mo-MDSC en ausencia de factores solubles inflamatorios o derivados de tumores, así como la transferencia a un hospedador sano no tratado previamente, diferencia estas células en macrófagos o células dendríticas. Adicionalmente, las condiciones hipóxicas (tales como el microambiente tumoral), podrían dirigir su diferenciación en macrófagos asociados a tumores (TAM) inmunosupresores de tipo M2. De forma similar, después de 24 horas de cultivo en ausencia de factores solubles inflamatorios o derivados de tumores, las PMN-MDSC se parecen fenotípica y funcionalmente a los granulocitos maduros (Gabrilovich et al., 2012). Adicionalmente, Las PMN-MDSC, que tienen una vida útil relativamente más corta y una menor capacidad de proliferación que las Mo-MDSC, podrían reponerse de Mo-MDSC en entornos patológicos (Youn et al., 2013).

Las MDSC ahora se consideran células clave que se expanden en situaciones patológicas y previenen respuestas inmunitarias adecuadas y están asociadas a morbilidades y comorbilidades significativas en un gran número de enfermedades. Primero, un número creciente de estudios demostró que los niveles de MDSC se correlacionan con la gravedad de las fases del cáncer, la metástasis y son un pronóstico independiente de la supervivencia general en

pacientes que padecen diversos tipos de cáncer: cánceres de mama, de colon, melanoma, de pulmón, de hígado, gástrico, renal, de páncreas, de vejiga, de próstata, ovárico, esofágico, sarcoma, glioblastoma, de cabeza y cuello, así como cánceres hematológicos linfoma, leucemia y mieloma (Díaz-Montero et al., 2009; Gabitass et al., 2011; Huang et al., 2013; Idorn et al., 2014; Kalathil et al., 2013; Khaled et al., 2013; Kitano et al., 2014; Shen et al., 2014; Solito et al., 2014; Sun et al., 2012; Weide et al., 2014; Zhang et al., 2013). Las MDSC ahora tienen una clara importancia de pronóstico en múltiples cánceres, y los datos emergentes respaldan la utilidad de las MDSC circulantes como un biomarcador predictivo para la inmunoterapia del cáncer e incluso como marcador principal temprano para predecir la respuesta clínica a la quimioterapia sistémica en pacientes con tumores sólidos avanzados (Kitano et al., 2014; Weide et al., 2014). Basándose en estos estudios clínicos y el número de informes preclínicos, dirigirse a MDSC ya sea en combinación con inmunoterapia contra el cáncer, quimioterapia o de forma independiente como parte de un enfoque para inhibir el proceso metastásico parece ser una estrategia muy prometedora desde el punto de vista clínico (Díaz-Montero et al., 2014).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

La acumulación de MDSC también se ha documentado en entornos sin cáncer. La evasión de la inmunidad del hospedador empleada por los patógenos para establecer la persistencia y la infección crónica es sorprendentemente paralela a los mecanismos de escape del tumor. Por tanto, se han informado MDSC en una diversidad de enfermedades infecciosas, incluyendo infecciones bacterianas (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa, Listeria monocytogenes, Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus,* neumonía bacteriana), parasitarias (por ejemplo, *Leishmania*), fúngicas (por ejemplo, *Candida*) y víricas (Hepatitis B y C, VIH, gripe, herpes) y se han asociado a persistencia de la infección crónica (Cai *et al.*, 2013; Goh *et al.*, 2013; Van Ginderachter *et al.*, 2010; Vollbrecht *et al.*, 2012). De hecho, se describió que las citocinas proinflamatorias producidas durante la fase aguda de la infección y el activador de partículas derivadas de patógenos del receptor tipo Toll (TLR) inducen y expanden las MDSC que amortiguarán las respuestas inmunitarias apropiadas y son corresponsables de la infección crónica. Adicionalmente, las MDSC generadas durante las infecciones víricas son particularmente interesantes, porque muchos virus también son oncogénicos y, conjuntamente, inducirán un entorno inflamatorio localmente disfuncional similar al de los tumores.

De manera similar a las enfermedades infecciosas o el cáncer, las MDSC también juegan un papel deletéreo significativo en la vacunación, tanto contra patógenos como contra antígenos tumorales. Por ejemplo, por un lado, los antígenos así como los adyuvantes usados en la composición de la vacuna contra el VIH activan y expanden las MDSC (Garg y Spector, 2014; Sui et al., 2014). Por otro lado, la inmunidad protectora después de la vacuna de Salmonella en pacientes se correlaciona directamente con la expansión reducida de MDSC (Heithoff et al., 2008) y el agotamiento de MDSC aumenta significativamente la inmunidad antitumoral después de la vacunación terapéutica (Śrivastava et al., 2012a, 2012b). También se han documentado altos niveles de MDSC en pacientes traumatizados, lesionados o quemados y los altos niveles de estas células mieloides inmaduras se asociaron significativamente a un alto riesgo de morbilidades, en particular provocadas por sepsis (Cheron et al., 2010; Cuenca et al., 2011; Janols et al., 2014; Makarenkova et al., 2006; Taylor et al., 2000; Venet et al., 2007; Zhu et al., 2014). Finalmente, debido a su expansión universal en casi todas las afecciones inflamatorias, independientemente de su etiología y fisiología, se han encontrado MDSC acumuladas también después de trasplante celular, de tejido o de órganos (Dilek et al., 2010; Ochando y Chen, 2012) así como en enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias crónicas, tales como esclerosis múltiple, enfermedades inflamatorias intestinales, artritis reumatoide, diabetes tipo 1 o hepatitis autoinmunitaria (Baniyash et al., 2014; Cripps y Gorham, 2011; Kurko et al., 2014; Serafini, 2013; Smith y Reynolds, 2014; Whitfield-Larry et al., 2014). Varios estudios en modelos experimentales de roedores han demostrado la importancia de estas células inmunosupresoras para mantener bajo control las respuestas inmunitarias en estas enfermedades anteriormente mencionadas. Una interpretación demasiado rápida de esto llevaría a la idea de usar estrategias terapéuticas que promuevan la acumulación de MDSC y/o eviten su diferenciación en células maduras para controlar las respuestas inmunitarias no deseadas en trasplante, enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias crónicas. Sin embargo, recientemente surgieron resultados contradictorios: mientras que las MDSC inducidas durante las fases inflamatorias agudas (aquellas estudiadas en modelos experimentales de roedores) son claramente beneficiosas, las MDSC que se encuentran en entornos inflamatorios crónicos pueden no compartir características similares. De hecho, en contraste con ambiente de cáncer, lesionado o infectado, las MDSC aisladas de entornos inflamatorios autoinmunitarios o crónicos parecen fallar al inhibir las células T ex vivo, y más bien se suman a la inflamación y al reclutamiento de MDSC (Cripps y Gorham, 2011). De forma similar, en enfermedades inflamatorias crónicas del intestino. las MDSC que se encuentran en el colon liberan una gran cantidad de IL-18 e IL-6, que promueven respuestas inmunitarias citotóxicas perjudiciales sesgadas por Th17 (Kurmaeva et al., 2014). En el trasplante sólido, las MDSC juegan un papel crítico en diferentes fases de inducción de tolerancia al injerto. En algunas fases podría ser útil disminuir la presencia de MDSC, especialmente las Mo-MDSC, en el injerto para mejorar los resultados clínicos (Hock et al., 2015).

Basándose en estas numerosas asociaciones clínicas y el papel clave que juega las MDSC en estas diversas patologías independientemente de su etiología y fisiología, los enfoques farmacéuticos que modulan las MDSC para prevenir o promover su acumulación representan ahora un campo de interés creciente. Sin embargo, hasta la fecha, no existe un enfoque terapéutico que permita una modulación eficaz de MDSC sin efectos secundarios adversos. De hecho, contrariamente a la mayoría de otras poblaciones celulares, las MDSC en los seres humanos no expresan marcadores específicos que permitan un direccionamiento directo y específico de estas células. Recientemente se descubrió que los fármacos quimioterapéuticos tales como gemcitabina, 5-fluorouracilo, docetaxel o glicinato de 2-hidroxiacetofenona pueden inducir la apoptosis de MDSC (Apetoh *et al.*, 2011; Vincent *et al.*, 2010). Sin embargo, su

efectividad para eliminar MDSC parece limitada y tales fármacos también inducen apoptosis no deseada de otras células y, por lo tanto, están asociados con toxicidades conocidas. Adicionalmente, este enfoque se enfrenta al problema de que la inflamación confiere resistencia MDSC a la apoptosis (Hu *et al.*, 2013; Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2012).

5

10

15

El desarrollo de estrategias para controlar las funciones inmunosupresoras de MDSC se ve dificultado por la multiplicidad de mecanismos de acción supresores (iNos, Arg1, ROS, RNS, agotamiento de nutrientes, muerte celular inducida por Fas, secreción de citocinas inmunosupresoras, desviación inmunitaria, inducción de Treg, ...). Además, estos mecanismos son diferentes dependiendo del tipo de MDSC (pro-mielocíticas, Mo-MDSC o PMN-MDSC). Los mecanismos en juego también dependen del tipo de inmunidad diana (linfocitos T y B, células NK, macrófagos, células dendríticas) o células no inmunitarias (por ejemplo, células de los vasos cuando aumentan la angiogénesis o células cancerosas cuando promueven la metástasis). Se ha intentado evitar la migración de MDSC (Highfill *et al.*, 2014) al sitio del tumor (por ejemplo, antagonista de CXCR2) pero las MDSC aún continúan ejerciendo su función inmunosupresora general inespecífica en la periferia. Adicionalmente, dado que CXCR2 se expresó solo por PMN-MDSC, pero no Mo-MDSC, este enfoque dejará intactas estas Mo-MDSC que se describieron como las MDSC supresoras más potentes y para reponer las PMN-MDSC como se analizó anteriormente. Para prevenir la inducción y generación de MDSC, también se ha intentado bloquear la liberación de factores por tumores o inflamación, que se identificaron como inductores de MDSC. Un ejemplo son los antagonistas de prostaglandina-E2 (PEG2) (Mao *et al.*, 2014). Sin embargo, estas estrategias se enfrentarán con muchos otros factores (por ejemplo, GM-CSF, M-CSF, IL-6, IL-13, S100A8/A9 etc.) responsable de la inducción de MDSC.

20

25

Otro concepto es dirigirse a MDSC para inducir su conversión en células maduras. Esto ofrece la ventaja de convertir las células inmunitarias perjudiciales (MDSC) en células efectoras (macrófagos y células dendríticas para Mo-MDSC y granulocitos para PMN-MDSC). Por ejemplo, ácido todo-trans-retinoico (ATRA), un metabolito de la vitamina A, podría neutralizar la alta producción de ROS y tiene potencial para convertir MDSC en granulocitos maduros (Nefedova et al., 2007). En asociación con GM-CSF, ATRA induce macrófagos y células dendríticas (Gabrilovich et al., 2001). Sin embargo, estos estudios se realizaron en ratones y cuando se evaluaron en humanos, ATRA tuvo una absorción y aclaramiento heterogéneos entre los individuos y no tuvo ningún efecto ni sobre el fenotipo ni sobre la función de las células mieloides maduras (Mirza et al., 2006). De forma similar, se ha demostrado que la vitamina D3 disminuye los niveles de células mieloides inmaduras in vitro e induciendo su maduración. Sin embargo, su efecto fue más moderado que ATRA. Los fragmentos de ADN que contienen una alta frecuencia de motivos de dinucleótido de desoxicitosinadesoxiguanina (CpG) no metilados pueden estimular las células inmunitarias a través del receptor tipo Toll 9 (TLR9). La administración local de CPG en ratones, por ejemplo en el tumor, se describió que disminuye PMN-MDSC (pero no Mo-MDSC), que altera modestamente su fenotipo y reducir, pero no abolir, su función supresora (James et al., 2014). Sin embargo, un estudio anterior demostró que CpG induce la diferenciación de los precursores de la médula ósea en MDSC, limitando por tanto su potencial in vivo para reducir el nivel de MDSC (Chen et al., 2013).

35

40

30

Como se describe en el presente documento, los inventores descubrieron que las MDSC podrían diferenciarse en una población nueva e inesperada de células linfoides no supresoras que tienen un fenotipo de células NK citotóxicas, diferentes de los macrófagos, células dendríticas o granulocitos. También identificaron que la proteína reguladora de señales alfa (SIRPa) controla estrechamente esta vía de diferenciación MDSC previamente no identificada. Una composición terapéutica destinada a promover esta nueva vía de diferenciación definitivamente tendrá el potencial de resolver el problema médico planteado por la acumulación de MDSC y la inmunodepresión/inmunomodulación asociada en diversos entornos patológicos. Al reducir la MDSC acumulada patógena y diferenciar la MDSC en células efectoras no supresoras, tales composiciones terapéuticas tienen un gran potencial para sinergizar con las

45

50

competentes, en particular funciones NK.

La proteína reguladora de señales alfa, o SIRPa (también denominada CD172a o SHPS-1) se identificó por primera vez como una proteína de membrana presente principalmente en macrófagos y células mieloides que se asoció con el dominio de la región 2 de homología Src (SH2) que contiene fosfatasas-SHP-1 y SHP-2. SIRPa es el miembro

inmunoterapias, quimioterapias y estrategias de vacunación actuales que requieren respuestas inmunitarias

prototípico de la familia de receptores emparejados SIRP de proteínas SIRP estrechamente relacionadas. El acoplamiento de SIRPa por CD47 proporciona una señal reguladora a la baja que inhibe la fagocitosis de la célula

huésped y, por lo tanto, CD47 funciona como una señal de "no me comas".

55

SIRPa se expresa en monocitos, la mayoría de las subpoblaciones de macrófagos tisulares, granulocitos, subconjuntos de células dendríticas (DC) en tejidos (linfoides), algunas células progenitoras de la médula ósea y en niveles variables en las neuronas, con una expresión notablemente alta en áreas del cerebro ricas en sinapsis, tales como la capa granular del cerebelo y el hipocampo (Seiffert et al, 1994; Adams et al, 1998; Milling et al, 2010).

60

La interacción de SIRPa con CD47 se describe en gran medida y proporciona una señal de regulación negativa que inhibe la fagocitosis de la célula hospedadora (véase la revisión Barclay et al, Annu. Rev. Immunol., 2014). Tanto CD47 como SIRPa también participan en otras interacciones. Los investigadores han sugerido que las proteínas de tensioactivo pulmonar SP-A y SP-D controlan las respuestas inflamatorias en el pulmón a través de interacciones con SIRPa (January et al. 2000)

65 SIRPa (Janssen et al, 2008).

Una de las funciones fisiológicas mejor caracterizadas de las interacciones CD47-SIRPa es su papel en la homeostasis de las células hematopoyéticas, en particular glóbulos rojos y plaquetas. Debido a que CD47 sirve como una señal de no me comas y, como tal, es un determinante importante de la fagocitosis de la célula hospedadora por macrófagos, la contribución potencial de las interacciones CD47-SIRPa en la eliminación de las células cancerosas se ha investigado intensamente en los últimos años.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

La vía SIRPa/CD47 también está actualmente sujeta a diferentes desarrollos farmacéuticos para mejorar la fagocitosis de macrófagos. De hecho, como células infectadas, las células cancerosas llevan una carga aberrante tales como proteínas desconocidas o proteínas normales a niveles anormales, sin embargo, estas células subvierten frecuentemente los mecanismos innatos de control inmunitario al sobreexpresar simultáneamente moléculas inmunorreguladoras. Es cada vez más claro que uno de esos mecanismos implica al CD47 (Barclay y Van den Berg. 2014), una proteína del "yo" expresada por las células normales. CD47 interactúa con SIRPa. Esto conduce a la transmisión de una señal de "no me comas" a los macrófagos fagocíticos, que después dejan las células diana sin afectar (Oldenborg et al., 2000). La sobreexpresión de CD47 por las células cancerosas las hace resistentes a los macrófagos, incluso cuando las células cancerosas están recubiertas con anticuerpos terapéuticos (Zhao et al., 2011), y se correlaciona con malos resultados clínicos en numerosos cánceres sólidos y hematológicos (Majeti et al., 2009; Willingham et al., 2012). En modelos experimentales, en particular modelos de xenoinjerto de tumor humano en ratones inmunodeficientes, el bloqueo de la vía CD47/SIRPa fue muy eficaz para promover la eliminación del tumor por parte de los macrófagos y disminuir la diseminación y formación de metástasis de las células cancerosas (Chao et al., 2011; Edris et al., 2012; Uluçkan et al., 2009; Wang et al., 2013). En estos estudios, no se ha estudiado la función o el fenotipo de MDSC. El bloqueo de la vía CD47/SIRPa, al mejorar la fagocitosis dependiente de anticuerpos por macrófagos, se ha descrito que actúa en sinergia con el agotamiento de los anticuerpos anticancerosos terapéuticos (Weiskopf et al., 2013) como Trastuzumab (anti-Her2), Cetuximab (anti-EGFR), Rituximab (anti-CD20) y Alemtuzumab (anti-CD52).

Un conjunto de divisiones que se vuelven cada vez más "borrosas" son las que se encuentran entre los linfocitos T, los linfocitos citolíticos naturales (NK) y las células NK-T. Estos subconjuntos comparten la expresión común de moléculas específicas, incluyendo la lectina CD161 de tipo C. Esta molécula de superficie se identificó originalmente como el homólogo humano de las glucoproteínas NKRP1 expresadas en células NK de roedores, demostrando una homología del 46-47 % con sus contrapartes de roedores. NKRP1A humano o CD161, está compuesto por un homodímero unido por disulfuro de subunidades de aproximadamente 40 kDa. Se expresa por la mayoría de las células NK y aproximadamente el 24 % de las células T periféricas (Lanier et al., 1994), incluyendo los subconjuntos que expresan TCR tanto  $\gamma\delta$  como  $\alpha\beta$  (Maggietal., 2010) y células NK-T. Como las células NK-T componen menos del 1 % de las células T de sangre periférica humana (Gumperzetal., 2002), las células T CD161+ deben representar un linaje distinto de los linfocitos T (Takahashi *et al.*, 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, se ha descrito que SIRPa regula la función fagocítica de las células mieloides, la presentación de antígenos y la secreción de citocinas de las células dendríticas y el tráfico de granulocitos maduros. Sin embargo, la función de SIRPa sobre la función supresora de MDSC nunca se ha desvelado. Dugast et al. (2008) mostraron por primera vez la expresión de SIRPa en MDSC de rata en un modelo de alotrasplante de riñón. Sin embargo, no identificaron ningún papel de la vía SIRPa/CD47 en la biología de MDSC, ni informaron de actividad supresora mediante el uso de anticuerpos anti-SIRPa. Por tanto, este documento no muestra ni sugiere que la inhibición de la ruta SIRPa en MDSC pueda diferenciar las células MDSC en células no supresoras como se describe en el presente documento.

El documento WO2010/130053 desveló un método para tratar el cáncer hematológico que comprende modular la interacción entre SIRPa humano y CD47. Este documento mostró que el bloqueo de SIRPa-CD47 induce la activación del sistema inmunitario innato a través de la ruta de la fagocitosis. En el modelo de trasplante de células mieloides de leucemia humana que usó esta solicitud de patente, el trasplante se rechazó cuando los animales fueron tratados con un antagonista de CD47. Este resultado sugiere un aumento de la fagocitosis tras el tratamiento con anti-CD47, pero no una inhibición de la actividad supresora de MDSC y/o una diferenciación de MDSC en células no supresoras.

En el documento WO0066159 se describió un método para inhibir el funcionamiento celular para su uso en terapias antiinflamatorias y antitumorales. Este método comprende administrar un fármaco que comprende una sustancia que reconoce específicamente el dominio extracelular de SIRP y que inhibe el funcionamiento de las células mieloides patológicas. Un ejemplo dado de células mieloides son los macrófagos, la mayoría de los anti-SIRPa descritos en los documentos tienen como objetivo bloquear la activación de los macrófagos e inhibir la fagocitosis. Este método no sugiere ninguna acción ventajosa de las moléculas anti-SIRPa sobre las células mieloides normales y más específicamente sobre MDSC.

La presente invención es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que bloquea específicamente la interacción entre la proteína reguladora de señal alfa (SIRPa) y CD47, para su uso en un método de tratamiento de carcinoma o melanoma hepatocelular.

65 Entre los compuestos que pueden usarse, pueden citarse anticuerpos y fragmentos de los mismos, especialmente anticuerpos anti-SIRP tales como aquellos usados en los experimentos descritos a continuación, o cualquier otro

anticuerpo bloqueante seleccionado entre los muchos anticuerpos anti-SIRPa disponibles en el mercado, fragmentos de anticuerpos, *etc.* 

De acuerdo con una realización particular, el compuesto que bloquea la interacción entre SIRPa y CD47 se usa para diferenciar MDSC monocítica (Mo-MDSC) en células no supresoras.

5

15

20

25

30

35

40

45

50

De acuerdo con otra realización particular, el compuesto que bloquea la interacción entre SIRPa y CD47 se usa para diferenciar MDSC en células linfoides no supresoras, preferentemente en células linfoides efectoras.

El compuesto que bloquea la interacción entre SIRPa y CD47 se elige preferiblemente de modo que las células no supresoras obtenidas por diferenciación de MDSC sean negativas para MHC de Clase II y positivas para al menos un marcador de linfocitos citolíticos naturales (NK). En la siguiente tabla se proporciona una lista no limitante de marcadores de células NK.

Tabla 1: Lista no exhaustiva de marcadores NK

Rata	Ratón	Ser humano	
CD161 (NKRP1)	CD161 (NKRP1)	CD161 (NKRP1)	
	CD335 (NKp46)	CD335 (NKp46)	
	CD122 (IL2Rbeta)	CD122 (IL2Rbeta)	
CD94 (NKG2)	CD94 (NKG2)	CD94 (NKG2)	
	CD314(NKG2D)	CD314 (NKG2D)	
Familia Ly49	Familia Ly49	CD336 (NKp44)	
Familia NKG2A	Familia NKG2A	CD337 (NKp30)	
	CD49b	CD158 (familia KIR)	
		CD16 (FcgllIA)	
		CD56	
		CD57	

Como se ha mencionado anteriormente, la inmunodepresión inducida por MDSC juega un papel importante y perjudicial en muchas enfermedades y afecciones. Entre las afecciones susceptibles de mejorarse o prevenirse mediante la diferenciación de las células supresoras derivadas mieloides (MDSC) en células no supresoras, pueden citarse el cáncer hepatocelular y el melanoma.

El compuesto que bloquea la interacción entre SIRPa y CD47 se usa para tratar a un paciente que tiene un cáncer seleccionado de carcinoma hepatocelular y melanoma. Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a cualquier reducción o mejora de la progresión, la gravedad y/o la duración del cáncer, particularmente un tumor sólido, la reducción de uno o más síntomas del mismo que resulta de la administración de una o más terapias. El tratamiento con un compuesto que bloquea la interacción entre SIRPa y CD47 puede administrarse junto con cualquier otro tratamiento antineoplásico, tales como cirugía, quimioterapia, terapia biológica, terapia inmunológica, etc. En caso de una co-administración, el efecto beneficioso del compuesto que bloquea la interacción entre SIRPa y CD47 se mide comparando la eficiencia del tratamiento combinado con la obtenida clásicamente con el mismo tratamiento pero sin dicho compuesto.

El cáncer a tratar puede ser metastásico. En otro aspecto de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se combina con un segundo agente terapéutico. De acuerdo con determinadas realizaciones de este aspecto de la invención, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en agentes quimioterapéuticos, radioterapia, ciruqía, agentes inmunoterapéuticos, antibióticos y probióticos.

En particular, el segundo agente terapéutico puede seleccionarse ventajosamente del grupo que consiste en vacunas terapéuticas y bloqueadores o activadores de puntos de control inmunitarios tales como, por ejemplo, anti-PDL1, anti-PDL1 anti-CTLA4 y anti-CD137. Como se ejemplifica en la parte experimental a continuación, estas combinaciones producen efectos sinérgicos.

La presente divulgación también se refiere a un método para determinar la eficacia de un tratamiento mediante un compuesto que bloquea la interacción entre SIRPa y CD47, que comprende medir la presencia de células no supresoras negativas para MHC de Clase II y positivas para al menos un marcador de linfocitos citolíticos naturales (NK) seleccionados del grupo que consiste en CD161, CD49b, NKp44, NKP46 y CD56, en una muestra de un paciente tratado con dicho compuesto.

El experto en la materia elegirá una muestra adecuada para realizar este método de seguimiento, dependiendo de la situación. Por ejemplo, cuando el tratamiento se administra a un paciente que padece un cáncer sólido, se usará ventajosamente una muestra del tumor. También puede usarse una muestra de sangre, en la misma situación pero también en otras situaciones, así como una muestra de tejido, una muestra de líquido sinovial, *etc.* 

Otras características de la invención también resultarán evidentes en el transcurso de la descripción que sigue de los experimentos y ensayos biológicos que se han realizado en el marco de la invención y que le proporcionan el soporte experimental requerido.

#### 5 Levendas de las figuras

10

15

20

25

40

45

50

55

65

## Figura 1: Las MDSC de ratones y de humanos expresan SIRPa

A/ Se tiñeron células de bazo de ratón recién aisladas con un anticuerpo monoclonal fluorescente anti-SIRPa de ratón y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células se subdividieron de acuerdo con el siguiente fenotipo: células CD11b<sup>-</sup> (histograma gris), células CD11b<sup>+</sup> MHC de Clase II<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> (Mo-MDSC; línea discontinua) y células CD11b<sup>+</sup> MHC de Clase II<sup>-</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> (PMN-MDSC; línea de puntos). B/ Se tiñeron células mononucleares de sangre periférica humana recién aisladas de voluntarios sanos con un anticuerpo monoclonal anti-SIRPa humano fluorescente y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células se subdividieron de acuerdo con el siguiente fenotipo: células CD11b<sup>-</sup> (histograma gris), células CD11b<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup> (línea sólida), células CD11b<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD15<sup>-</sup> (Mo-MDSC; línea discontinua) y células CD11b<sup>+</sup> MHC HLA-DR<sup>-</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup> (PMN-MDSC; línea de puntos).

Figura 2: El mAb anti-SIRPa induce el cambio del fenotipo de Mo-MDSC húmanas después de dos días de cultivo El fenotipo de Mo-MDSC humanas (células CD11b+ HLA-DR-/bajo CD33+ CD14+ CD15-) para la expresión de CD161 y CD11c directamente después de la clasificación por citometría de flujo (izquierda) o después de dos días de cultivo con un anticuerpo monoclonal irrelevante de control o un anticuerpo monoclonal anti-SIRPa.

Figura 3: El mAb anti-SIRPa induce un cambio en el fenotipo de MDSC de rata después de dos días de cultivo El fenotipo de MDSC (células de bazo CD11b<sup>+</sup> MHC de Clase II<sup>-</sup> NKRP1<sup>bajo</sup>) para los marcadores indicados directamente después de la clasificación por citometría de flujo (histograma gris) o después de dos días de cultivo con un anticuerpo monoclonal irrelevante de control (línea de puntos) o anticuerpo monoclonal anti-SIRPa (línea continua)

<u>Figura 4: La diferenciación inducida por mAb anti-SIRPa supera la diferenciación inducida por GM-CSF</u>
El fenotipo de MDSC de rata ( células de bazo CD11b<sup>+</sup> MHC de Clase II<sup>-</sup> NKRP1<sup>bajo</sup>) para MHC de Clase II y CD103 (arriba) o CD11b y CD80 (abajo) después de dos días de cultivo con un anticuerpo monoclonal irrelevante de control (línea de puntos) o un anticuerpo monoclonal anti-SIRPa (línea continua), con o sin adición de GM-CSF.

Figura 5: Funciones inmunosupresoras de pérdida de MDSC diferenciadas inducidas por mAb anti-SIRPa

A/ Proliferación de linfocitos T en presencia de la proporción indicada de MDSC recién purificadas (no diferenciadas) y un anticuerpo monoclonal irrelevante de control (barras blancas) o anticuerpo monoclonal anti-SIRPa (barras negras). B/ Proliferación de linfocitos T en presencia de la proporción indicada de MDSC cultivadas dos días con un anticuerpo monoclonal irrelevante de control (barras blancas) o anticuerpo monoclonal anti-SIRPa (barras negras). No se añadió ningún anticuerpo adicional durante el ensayo de proliferación con MDSC diferenciadas.

Figura 6: El tratamiento con mAb anti-SIRPa rompe la tolerancia inmunitaria dependiente de MDSC La variación porcentual de Creatininemia (A) y Uremia (B) desde el día Oto 200 y C/ Supervivencia sin rechazo de receptores de aloinjertos de riñón de rata tolerantes tratados con un anticuerpo irrelevante de control (ronda abierta,

n=4) o anticuerpo monoclonal anti-SIRPa (cuadrado negro, n=4). La línea de puntos en A y B representa un 30 % del umbral de variación, por encima del cual los animales se consideraron en rechazo.

<u>Figura 7: El tratamiento con mAb anti-SIRPa disminuye las MDSC y aumenta las células NK en la periferia</u> El porcentaje de variación desde el día 0 de MDSC en células mieloides (A) o leucocitos totales (B) de receptores de aloinjerto renal tolerado y ratas sin tratamiento previo después de un promedio de diez días de tratamiento con

un anticuerpo de control irrelevante (ronda abierta) o anticuerpo monoclonal anti-SIRPa (cuadrado negro). C/ Igual que en B, para el porcentaje de variación desde el día 0 de células NK (CD161<sup>alto</sup>) en leucocitos totales.

Figura 8: El tratamiento con mAb anti-SIRPa induce la infiltración de células NK y macrófagos

Tinción de inmunohistología de injerto de linfocitos T (TCRαβ+), células NK (CD161+), macrófagos (CD68+) y células mieloides (CD11b/c+) de un receptor de aloinjerto renal tolerado tratado con un anticuerpo irrelevante de control (izquierda) o un anticuerpo monoclonal anti-SIRPa (derecha).

Figura 9: El tratamiento con mAb anti-SIRPa reduce la infiltración de células T reguladoras.

Tinción de inmunohistología de injerto de linfocitos T (TCRαβ+) y células T reguladoras (TCRαβ+Foxp3+) de un receptor de aloinjerto renal tolerado tratado con un anticuerpo irrelevante de control (izquierda) o un anticuerpo monoclonal anti-SIRPa (derecha). Figura 10: El tratamiento con mAb anti-SIRPa prolonga la supervivencia en un modelo de cáncer de carcinoma hepatocelular.

Supervivencia global de los ratones inoculados con 2,5 x 10<sup>6</sup> células de hepatoma de ratón Hepa 1.6 a través de la vena porta y tratadas con un anticuerpo irrelevante de control (línea de puntos) o un anticuerpo monoclonal anti-SIRPa (línea continua) 3 veces por semana, o diariamente con una sonda oral de Sorafenib (línea discontinua) como estándar de control de cuidados.

Figura 11: El mAb anti-SIRPa induce el reclutamiento de leucocitos tumorales mientras reduce las MDSC en el modelo de cáncer de carcinoma hepatocelular.

Los ratones inoculados con 2,5 x 10<sup>6</sup> células tumorales Hepa 1.6 se sacrificaron a través de la vena porta dos semanas después de la inoculación del tumor. Las células hepáticas no parenquimatosas (NPC) se extrajeron, se contaron y se analizaron por citometría de flujo. A/ Número de NPC del hígado extraídas, B/ Número de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) en las NPC del hígado y C/ porcentaje de Mo-MDSC (CD11b<sup>+</sup>MHC de Clase II<sup>-</sup> Ly6C<sup>alto</sup> Ly6G<sup>-</sup>) en células mieloides CD11b<sup>+</sup> de ratones tratados con un anticuerpo irrelevante de control (barras blancas, n=7) o un

anticuerpo monoclonal anti-SIRPa (barras negras, n=7) 3 veces por semana.

Figura 12: El mAb anti-SIRPa induce la acumulación de células NK maduras en el modelo de carcinoma hepatocelular.

- Los ratones inoculados con 2,5 x 10<sup>6</sup> células tumorales Hepa 1.6 se sacrificaron a través de la vena porta dos semanas después de la inoculación del tumor. Las células hepáticas no parenquimatosas (NPC) se extrajeron, se contaron y se analizaron por citometría de flujo. A/ Número de células NK (CD161<sup>+</sup>) extraídas en NPC de hígado extraídas de ratones tratados con un anticuerpo de control irrelevante (barras blancas, n=7) o anticuerpo monoclonal anti-SIRPa (barras negras, n=7) 3 veces por semana. B/ Expresión de CD27 (marcador NK inmaduro) y CD11b (marcador NK maduro) de las células NK NPC del hígado.
- 10 <u>Figura 13: El mAb anti-SIRPa induce la acumulación de células NK maduras en el modelo de carcinoma</u> hepatocelular.
  - Los ratones inoculados con 2,5 x 10<sup>6</sup> células tumorales Hepa 1.6 se sacrificaron a través de la vena porta dos semanas después de la inoculación del tumor. Las células hepáticas no parenquimatosas (NPC) se extrajeron, se contaron y se analizaron por citometría de flujo. Número de subpoblaciones de células NK en NPC de hígado como sigue: doble negativo (DN) para CD11b y CD27 (pNK: precursor NK); CD27 solo (CD27 SP) positivo (iNK: NK inmadura); doble positivo para CD27 y CD11b (eNK NK efectora); CD11b solo (CD11b SP) positivo (mNK: NK madura); y Ly6C<sup>+</sup> células NK.
  - Figura 14: El mAb anti-SIRPa reduce el número de MDSC y aumenta las células NK que se infiltran en tumores en el tumor del modelo de melanoma.
- Los ratones que se inyectaron por vía subcutánea con 2x 10<sup>6</sup> células de melanoma B16 y se trataron con un anticuerpo irrelevante de control (arriba) o un anticuerpo monoclonal anti-SIRPa (abajo) 3 veces por semana se sacrificaron dos semanas después de la inoculación del tumor. Se extrajeron las células infiltrantes de leucocitos del tumor y se analizó la proporción de (A) MDSC (CD11b<sup>+</sup> Clase II<sup>-</sup> Ly6C<sup>alto</sup>) y la proporción de (B) células NK (CD161<sup>+</sup>) por citometría de flujo. Los resultados son representativos de 5 ratones en cada condición.
- Figura 15: El mAb anti-SIRPa aumenta significativamente la supervivencia de los ratones tratados conjuntamente con el anticuerpo anti-PDL1 y reduce el número de Mo-MDSC en un modelo *in vivo* de melanoma.

  Al mismo tiempo que la inoculación del tumor, los animales fueron tratados con anticuerpo de control de isotipo (Iso Ctrl: estrella: n=5) o un anticuerpo anti-Sirpa (clon p84: cuadrado; n=5) o un anticuerpo anti-PD-L1 (mAb 10F-
- 9G2: triángulo; n=8) ó un tratamiento combinado (anti-Sirpa+anti-PD-LI: círculo; n=5). A. Después se analizó la tasa de supervivencia general. B. Algunos animales fueron sacrificados 2 semanas después de la primera inoculación, los animales tratados con anticuerpos irrelevantes se compararon con animales que recibieron anticuerpo anti-SIRPa. Se extrajeron células infiltrantes de leucocitos tumorales y se analizó la proporción de marcadores de Mo-MDSC mediante FACS usando CD11b+ Clase II- Ly6Calto.
- Figura 16: El tratamiento anti-SIRPa modifica la expresión de ARNm de los marcadores de la superficie celular de las células infiltrantes después de romper la tolerancia inmunitaria en un modelo de trasplante de riñón de rata. Se midió la expresión de ARNm de CD80, CD86, CD14, CD11b, IL12p40, CD103, NKRP1, MHCII y aumenta después del tratamiento anti-SIRPa en comparación con el control tolerante.
  - <u>Figura 17:</u> Efecto de un único tratamiento anti-Sirpa o un tratamiento inmunomodulador combinado en un modelo *in vivo* de hepatocarcinoma:
- Una semana después de la inoculación del tumor, los animales fueron tratados 3 veces/semana durante 4 semanas A. con anticuerpo de control de isotipo (Iso Ctrl: cuadrado negro: n=33) o un anticuerpo anti-Sirpa (clon p84: cuadrado gris; n=33) o un anticuerpo antiCD137 (mAb 4-1BB: triángulo negro; n=8) o un tratamiento combinado (Anti-Sirpa+anti-CD137: diamante gris; n=8). Después se analizó la tasa de supervivencia general. B. los animales fueron tratados 2 veces/semana durante 4 semanas con anticuerpo de control de isotipo (Iso Ctrl: cuadrado negro:
- 45 n=5) o un anticuerpo anti-Sirpa (clon p84: cuadrado gris; n=5) o un anticuerpo anti-PD-L1 (mAb 10F-9G2: triángulo negro; n=8) o un tratamiento combinado (anti-Sirpa+anti-PD-L1: diamante gris; n=5). Después se analizó la tasa de supervivencia general.

## **Ejemplos**

50

5

15

1. Materiales y métodos

## Fenotipo MDSC

Las MDSC de sangre humana se caracterizaron y clasificaron mediante citometría de flujo de la siguiente manera: CD11b+CD33+ HLA-DRbajo/- CD14+ CD15-para Mo-MDSC y CD11b+CD33+ HLA-DR- CD14- CD15+ para PMN-MDSC. Las MDSC de sangre y bazo de rata se caracterizaron y se analizaron por citometría de flujo como CD11b+ MHC de Clase II-NKRP1int (tanto Mo-MDSC como PMN-MDSC se incluyeron en este fenotipo). Las MDSC de ratón se caracterizaron como sigue: CD11b+ MHC de Clase II- Ly6Calto Ly6G- para Mo-MDSC y CD11b+MHC de Clase II- Ly6C+ Ly6G+ para PMN-MDSC.

## Purificación y cultivo de MDSC

Las MDSC se purificaron mediante citometría de flujo de acuerdo con los fenotipos descritos anteriormente. La pureza de las células clasificadas por citometría de flujo fue más alta que el 99 %. Después se sembraron MDSC recién purificadas a 50 x 10<sup>3</sup> células/pocillo en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos y se cultivaron durante

dos días en medio RPMI-1640 (suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mI, 0,1 mg/mI de estreptomicina, suero de ternera fetal inactivado por calor al 10 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, HEPES 5 mM, piruvato sódico 1 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM) y con anticuerpo irrelevante de control o anticuerpo monoclonal anti-SIRPa (clon SE7C2 (Santa Cruz Biotechnology) y SE5A5 (Biolegend) para MDSC humanas o clon ED9 (AbD Serotec) para MDSC de rata) a 10 mg/mI. En un escenario diferente, también se añadieron GM-CSF recombinantes (10 ng/mI) para forzar la diferenciación de macrófagos/células dendríticas. Después de dos días, se recogió el sobrenadante y las células se retiraron incubando con EDTA 2 mM durante 5 min a 37 °C. Las células se tiñeron con anticuerpo fluorescente para caracterizar su fenotipo mediante citometría de flujo. En paralelo, las células se resuspendieron en medio de cultivo para evaluar su función inmunosupresora sobre la proliferación de linfocitos T.

#### Ensayo de función inmunosupresora de MDSC

10

15

20

30

35

40

45

50

55

60

65

Se recubrieron placas de 96 pocillos de fondo plano con anticuerpos anti-CD3 (0,5 mg/ml; 2 horas a 37 °C). Se sembraron células de bazo de rata a 50 ≥ 10³ células/pocillo por triplicado y se cultivaron durante 3 días en medio RPMI-1640 (suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, 0,1 mg/ml de estreptomicina, suero de ternera fetal inactivado por calor al 10 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, HEPES 5 mM, piruvato sódico 1 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM) con 2 mg/ml de anticuerpos monoclonales anti-CD28. Se añadió una proporción diferente de MDSC recién aislada en el día 0 de cultivo en estos cultivos de linfocitos T activados policlonalmente. El anticuerpo de control o anticuerpo anti-SIRPa (SE7C2, Santa Cruz Biotechnology®, inc. o SE5A5, Biolegend®) se añadió a 10 mg/ml desde el día 0 de cultivo. En otras placas, las Mo-MDSC mantenidas durante 48 h en presencia de anticuerpos control o anti-SIRPa se lavaron para retirar los anticuerpos y se añadieron en diferentes proporciones en un ensayo de supresión similar, sin adición de nuevos anticuerpos. La proliferación se midió el día 3 mediante la adición de 0,5 mCi [³H] timidina por pocillo.

#### 25 <u>Modelo de rata con tolerancia al aloinjerto renal</u>

Se obtuvieron ratas congénicas Lewis.1W (RT1u) y Lewis.IA (RT1a) macho de siete a nueve semanas de edad de Janvier (Savigny/Orges, Francia) y se mantuvieron en las instalaciones de los inventores para animales en condiciones específicas libres de patógenos, de acuerdo con las directrices institucionales. Se realizaron aloinjertos de riñón, como se describió anteriormente (Dugast *et al.*, 2008). Un Lewis nativo. El riñón 1W (lado derecho) se reemplazó por el aloinjerto del donante LEW.1A y se realizó una nefrectomía contralateral 7 d después, tiempo después de la cual la supervivencia del receptor dependía del buen funcionamiento del aloinjerto. Estas ratas se trataron con un anticuerpo anti-CD28 (hibridoma JJ319) i.p. a 0,3 mg/día durante 7 días, a partir del día del trasplante. Sin tratamiento, los injertos se rechazaron 11 días después del trasplante. Los animales se consideraron tolerantes cuando no se produjo ningún rechazo dentro de los 100 días. A continuación, los receptores tolerantes se trataron i.p. con 500 mg de anticuerpo anti-SIRPa (clon ED9, AbDSerotec) o anticuerpo irrelevante de control (clon 3G8) el día 150 y después 300 mg dos veces/semana durante 21 días. Se extrajeron muestras de sangre para análisis de citometría de flujo. La creatininemia y la uremia se monitorizaron en suero. Los animales se sacrificaron cuando la disfunción del injerto renal se evidenció por un aumento de 2 veces desde el día 0 de creatininemia o uremia.

## Tinción inmunohistoquímica

Se prepararon secciones congeladas (10 mm) a partir de biopsias renales. Los portaobjetos se secaron al aire a temperatura ambiente durante 1 hora antes de la fijación con acetona durante 10 min a temperatura ambiente. Las secciones estaban saturadas y, cuando se requirió (i.g. tinción Foxp3) se permeabilizaron con saponina al 0,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), en la solución saturada (PBS que contiene suero de rata al 5 %, suero de cabra normal al 2 % y BSA al 4 %). Las secciones se incubaron durante la noche con anticuerpo primario a 4 °C, seguido de anticuerpo secundario fluorescente o anticuerpo secundario biotinilado y coloreado con ABC Vectastainkit (Vector, Burlingame, CA) y kit de diaminobenzidina (DAB) antes de la coloración con eosina y hematoxilina. Los portaobjetos se analizaron utilizando microscopía convencional o de fluorescencia y el software de imágenes AxioVision (Carl Zeiss, Le Pecq, Francia).

El anticuerpo primario usado fue anti-TCR $\alpha\beta$  de rata (clon R73), CD161 (clon 3.2.3), CD68 (clon ED1), CD11b/c (clon OX42) y Foxp3 (clon FJK-16s).

## PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó en un sistema Viia7 de Applied Biosystems usando reactivos de núcleo de PCR SYBR Green y TaqMan. El ARN se extrae de la homogeneización de los tejidos renales en reactivo Trizol, se separa del ADN y las proteínas con cloroformo, se precipita con isopropanol, se lava con etanol, se seca y después se resuspende en agua libre de ARNasa. Después de un tratamiento con DNAsa, el ARN se retro-transcribe para obtener ADN complementario (ADNc). La expresión génica relativa se calculó con el método 2(-dCt) en comparación con el gen de mantenimiento HPRT. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Se comparó la expresión de genes de interés entre animales tolerantes tratados con anticuerpo de control (3G8) o anticuerpo anti-SIRPa (ED9).

#### Tabla 2: Cebadores usados en la PCR cuantitativa

Cebadores (rata)	Sentido	Secuencia de 5' a 3'	SEQ ID NO
rHPRTFor	Directo	CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC	1
rHPRTRev	Inverso	TTCGCTGATGACACAACATGA	2
rCD14For	Directo	CAACAGGCTGGATAGGAAACCT	3
rCD14Rev	Inverso	TGACTACGCCAGAGTTATACGC	4
rCD86For	Directo	ACAGCAAAAGACACCCACGG	5
rCD86Rev	Inverso	CTTGTTTCATTCTGAGCCTCCTC	6
rIL12p40For	Directo	TCATCAGGGACATCATCAAACC	7
rIL12p40Rev	Inverso	CGAGGAACGCACCTTTCTG	8
rCD80For	Directo	GGCATTGCTGTCCTGTGATTAC	9
rCD80Rev	Inverso	GGAGTAGTTGTTAGCGATGTCGTA	10

Tabla 3: Conjuntos de cebadores/sondas usados para las mediciones de expresión génica de TagMan

Diana	Referencia del conjunto de sonda/cebador de ThermoFisher
CD103 (alfa integrina e)	Rn01460526_m1
CD11b	Rn00709342_m1
Clase II	Rn01429090_g1
NKRP1 (CD161a)	Rn01749035_m1

## Modelo de ratones con carcinoma hepatocelular

Los ratones machos C57B1/6J de ocho semanas recibieron 2,5 x 10<sup>6</sup> células de hepatoma de ratón Hepa1.6 en 100 ml a través de la vena porta, como se describió anteriormente (Gauttier *et al.*, 2014). Cuatro y ocho días después de la inoculación del tumor, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 100 mg de mAb anti-CD137 de rata (mAb 4-1BB) o con 300 mg de anticuerpo monoclonal SIRPa anti-ratón (clon P84 de Merck Millipore) o ambos anticuerpos o un anticuerpo de control irrelevante (clon 3G8) 3 veces a la semana durante 4 semanas (Figura 17A) o con 200 mg del mAb anti-PD-L1 (clon 10F-9G2 de BioXCell) o recibieron ambos anticuerpos (anti-Sirpa + anti-PDL1) durante 4 semanas (Figura 17B). Los ratones tratados con Sorafenib (Nexavar-Bayer) recibieron 100 ml diarios de alimentación por sonda oral de 40 mg/kg desde el día 0 al día 28 (Figura 10). Se analizó la supervivencia global. Se sacrificaron algunos ratones el día 14 después de la inoculación del tumor para la cuantificación y caracterización de la infiltración tumoral de leucocitos por aislamiento de células no parenquimatosas del hígado mediante un gradiente de Percoll y análisis FACS.

## Modelo de ratones melanoma

Ratones macho C57B1/6J de ocho semanas de edad recibieron una inyección subcutánea de 2 x 10<sup>6</sup> células de melanoma de ratón B16-Ova en el flanco. Los ratones se trataron i.p. desde el día 0 después de la inoculación del tumor con 300 mg de un anticuerpo irrelevante de control (clon 3G8) o con un anticuerpo monoclonal anti-ratón SIRPa (clon P84) 3 veces por semana o con 200 mg del mAb anti-PD-L1 (clon 10F-9G2 de BioXCell) dos veces por semana o recibió ambos anticuerpos (anticuerpos anti-Sirpa y anti-PD-L1) durante 4 semanas. Algunos animales se sacrificaron dos semanas después de la inoculación del tumor a infiltrados de leucocitos tumorales caracterizados mediante citometría de flujo. Se analizó la supervivencia global.

## 2. Resultados

5

10

15

35

#### 30 Las MDSC expresan SIRPa

Los inventores describieron anteriormente (Dugast *et al.*, 2008) que las MDSC (monocíticas y granulocíticas) de rata expresan un alto nivel de SIRPa en su superficie. La Figura 1 ahora muestra que las Mo-MDSC y PMN-MDSC de ratón también expresan SIRPa en su superficie a un nivel similar al de las células mieloides maduras (CD11b<sup>+</sup> de Clase II<sup>+</sup>). Por el contrario, en seres humanos, SIRPa se expresa solo en Mo-MDSC, en niveles similares a las células mieloides maduras (CD11 b<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>), mientras que las PMN-MDSC no expresan SIRPa.

#### SIRPa controla la diferenciación de Mo-MDSC en células no supresoras con un fenotipo similar a NK.

5

10

15

20

25

35

40

45

50

55

60

65

Los presentes inventores primero observaron que los anticuerpos monoclonales dirigidos a SIRPa y antagonizando su interacción con CD47 no afectaron a la supervivencia de Mo-MDSC in vitro, durante un período de 48 h. Por el contrario, las Mo-MDSC modificaron su fenotipo en comparación con Mo-MDSC recién aisladas o con Mo-MDSC cultivadas durante 48 h con un anticuerpo de control (Figura 2 y 3). Mientras que se describió anteriormente que las MDSC se diferencian en macrófagos o macrófagos asociados a tumores (TAM), células dendríticas o granulocitos, aquí se observó que las Mo-MDSC diferenciadas mAbs anti-SIRPa no mostraban estos fenotipos. Por el contrario, la incubación en presencia de GM-CSF indujo la diferenciación en el fenotipo descrito anteriormente. (Figura 4). Sorprendentemente, en la especie de rata, las MDSC tratadas con anti-SIRPa no adquirieron un alto nivel de moléculas de clase MHC II, ni de CD68, y en su lugar perdió la adquisición del marcador CD4. En seres humanos, estas células perdieron la expresión de CD11c y no adquirieron HLA-DR. Inesperadamente, los presentes inventores observaron que estas células expresaban un alto nivel de marcadores específicos de NK, en particular CD161 y CD49b, y marcadores de células maduras (CD44 h, CD103, CD80, CD86). También expresaron otro marcador del linaje linfoide (CD25, CD28, CD2) confirmando que estas células se han diferenciado por el anticuerpo monoclonal anti-SIRPa en células linfoides maduras (no mieloides). Adicionalmente, para confirmar que anti-SIRPa indujo la diferenciación en células no mieloides, los presentes inventores cultivaron MDSC con anticuerpos monoclonales GM-CSF y anti-SIRPa. Mientras que GM-CSF solo induce la diferenciación de MDSC en células mieloides de MHC de Clase II<sup>+</sup> maduras (i.d. células dendríticas y macrófagos), los presentes inventores observaron que las GM-CSF no tuvieron efecto cuando se asoció con el anticuerpo anti-SIRPa y no evitó la nueva ruta de diferenciación inducida por el anticuerpo anti-SIRPa (Figura 4). Estos resultados demostraron que el anticuerpo monoclonal anti-SIRPa induce la diferenciación de MDSC en células con un fenotipo efector similar a NK (CD161<sup>+</sup>) y que estas superan su ruta de diferenciación convencional. Finalmente, para confirmar el mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales anti-SIRPa, los presentes inventores primero evaluaron su capacidad para romper la función inmunosupresora de MDSC. Si bien los anticuerpos monoclonales anti-SIRPa no modificaron la función supresora de MDSC recién aisladas, los presentes inventores observaron que las MDSC diferenciadas in vitro por anticuerpos anti-SI RPa habían perdido su capacidad para suprimir la proliferación de linfocitos T (Figura 5). Para resumir, los anticuerpos monoclonales anti-SIRPa indujeron la diferenciación de Mo-MDSC en células linfoides de tipo NK efectoras no supresoras.

#### 30 Los anticuerpos monoclonales anti-SIRPa rompen la tolerancia inmunológica dependiente de MDSC in vivo

Anteriormente los presentes inventores describieron que la tolerancia al aloinjerto renal inducida por el tratamiento monoclonal anti-CD28 en ratas se mantiene mediante la acumulación de Mo-MDSC (Dilek et al., 2012; Dugast et al., 2008). Para confirmar in vivo que el anticuerpo monoclonal anti-SIRPa podría romper la inmunodepresión sostenida por MDSC, independientemente de su efecto sobre la eliminación del tumor al mejorar la fagocitosis de los macrófagos, los presentes inventores trataron a un receptor de aloinjerto renal tolerante con un anticuerpo monoclonal anti-SIRPa o un anticuerpo irrelevante de control. Los presentes inventores observaron que los receptores tolerantes rechazaron su aloinjerto dentro de los dos o tres meses posteriores al tratamiento anti-SIRPa, mientras que la función del injerto se mantuvo estable con el anticuerpo de control (Figura 6). El análisis de inmunofenotipado de sangre periférica de estos animales confirmó la observación in vitro, ya que los presentes inventores observaron una disminución significativa de MDSC después de un promedio de diez días de tratamiento con tratamiento con anticuerpos anti-SIRPa. De forma similar, mientras que las células NK no expresaron SIRPa, los presentes inventores observaron un aumento significativo de células de linaje NK (CD161+) después de una media de diez días de tratamiento con un tratamiento con anticuerpos anti-SIRPa. El examen histológico de los injertos explantados no reveló el rechazo celular agudo esperado mediado por linfocitos T. Por el contrario, los presentes inventores observaron que la infiltración de linfocitos T originalmente presente en el injerto de receptores tolerantes, fue incluso menos pronunciado en el injerto de animales rechazados después del tratamiento con anticuerpo anti-SIRPa (Figura 8). Los presentes inventores describieron previamente que la acumulación de MDSC periférica en este modelo está asociada a una acumulación de células T reguladoras del injerto (Dilek et al., 2012). Los presentes inventores describen aquí que el tratamiento con anticuerpos anti-SIRPa también modula indirectamente las células T reguladoras, ya que estas células apenas eran detectables en el injerto del receptor tratado con anti-SIRPa (Figura 9). Adicionalmente, aunque la infiltración de células mieloides (CD11b/c) sique siendo similar entre grupos, las células mieloides maduras, tales como macrófagos, fueron más abundantes en el inierto de receptores tratados con anti-SIRPa. Más importante aún, mientras que las células NK (CD161+) apenas eran detectables en el injerto de receptores tolerados, los presentes inventores observaron una infiltración significativa del injerto en el receptor tratado con anti-SIRPa, confirmando los estudios in vitro y la observación periférica in vivo de que el anticuerpo anti-SIRPa modula tanto las células MDSC como las células NK.

# El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-SIRPa moduló las células MDSC y NK infiltrantes de tumores y previno la mortalidad en modelos de cáncer

Los presentes inventores administraron anticuerpo monoclonal anti-SIRPa en modelos murinos de carcinoma hepatocelular y melanoma. El modelo de ratón de carcinoma hepatocelular (Hepa 1.6) es un modelo de cáncer agresivo que induce la muerte dentro de las dos semanas posteriores a la inoculación de la línea celular tumoral en el hígado. En este modelo, el estándar de atención quimioterapéutico aprobado (por ejemplo, sorafenib) rescató un promedio del 60 % de los ratones (Figura 10). En este modelo restrictivo, los presentes inventores observaron que el

tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-SIRPa en monoterapia protegía significativamente a los ratones con una efectividad similar a la de Sorafenib. Curiosamente, mientras que la infiltración tumoral se aumentó significativamente (en particular linfocitos T) después de dos semanas de tratamiento con anticuerpo anti-SIRPa, los presentes inventores observaron una disminución significativa de MDSC dentro de las células mieloides (Figura 11C). Adicionalmente, los presentes inventores también observaron un aumento significativo de infiltración de células NK (CD161+) en estos tumores en comparación con ratones control (Figura 12), en particular una acumulación de células NK maduras (CD11b+ CD27-) (Figura 13). De hecho, se describió previamente que el fenotipo CD27+ Cd11bcorresponde a células NK inmaduras incapaces de citotoxicidad y que producen un bajo nivel de citocinas, el fenotipo CD11b<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> a las células NK efectoras que producen citocinas pero poco citotóxicas, y el fenotipo CD11b<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> a células NK maduras y altamente citotóxicas (Desbois et al., 2012). Para confirmar estos resultados en otro modelo de tumor. los presentes inventores usaron un modelo de ratón con melanoma B16. De forma similar, los leucocitos extraídos del tumor de ratones tratados durante dos semanas con anticuerpo monoclonal anti-SIRPa también mostraron disminución intratumoral de Mo-MDSC (Figura 15B) y acumulación de células NK (CD161+) (del 4,23 % de las células en la condición de anticuerpo irrelevante al 12.4 % en animales tratados con anti-Sirpa (Figura 14)). La Figura 15A representa la tasa de supervivencia general de los animales inoculados con melanoma. y tratados con un anti-PD-L1 o con un anti-SIRPa o con ambos durante 4 semanas. En comparación con el tratamiento con moléculas individuales. la combinación de anticuerpos mostró un efecto sinérgico.

## Efecto del bloqueo SIRPa en un modelo in vivo de hepatocarcinoma

La Figura 17A representa la tasa de supervivencia global de los animales inoculados con hepatocarcinoma y tratados con un anti-CD137, un anti-Sirpa o ambos durante 4 semanas. El 30 % de los animales tratados con anti-Sirpa sobrevivieron más de 20 días después de la inoculación. Este resultado es comparable a los resultados obtenidos cuando los animales recibieron el anticuerpo anti-CD137. Curiosamente, el 100 % de los animales que recibieron el combo anti-Sirp+anti-CD137 sobrevivió. En comparación con los resultados obtenidos con cada molécula sola, esto muestra un fuerte efecto sinérgico de las 2 moléculas.

La Figura 17B representa la tasa de supervivencia global de los animales inoculados con hepatocarcinoma y tratados con un anti-PD-L1, un anti-Sirpa o ambos durante 4 semanas. Como se observó antes, el 20 % de los animales tratados con anti-Sirpa sobrevivieron más de 20 días después de la inoculación. Los resultados mostraron una tasa de supervivencia muy interesante cuando los animales fueron tratados con ambas moléculas, en comparación con cada tratamiento. Este resultado muestra un efecto sinérgico del anticuerpo anti-SIRPa con el anticuerpo anti-PD-L1 en un modelo de cáncer.

Los experimentos *in vivo* en 2 modelos de cáncer diferentes demostraron que SIRPa es una diana interesante para el tratamiento del cáncer como monoterapia y más aún cuando se combina con otras inmunoterapias o quimioterapia. Estos resultados demuestran que SIRPa es un nuevo punto de control que es importante bloquear con el objeto de inducir células no supresoras en el tumor.

#### 40 REFERENCIAS

10

15

20

25

30

45

Adams S, Van der Laan LJ, Vernon-Wilson E, Renardel de Lavalette C, Dopp EA, et al. 1998. Signalregulatory protein is selectively expressed by myeloid and neuronal cells. J. Immunol. 161:1853-59

Apetoh, L., Vegran, F., Ladoire, S. y Ghiringhelli, F. (2011). Restoration of antitumor immunity through selective inhibition of myeloid derived suppressor cells by anticancer therapies. Curr. Mol. Med. 11, 365-372.

Baniyash, M., Sade-Feldman, M. y Kanterman, J. (2014). Chronic inflammation and cancer: suppressing the suppressors. Cancer Immunol. Immunother. 63, 11-20.

Barclay, A.N. y Van den Berg, T.K. (2014). The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRPa) and CD47: structure, function, and therapeutic target. Annu. Rev. Immunol. 32, 25-50.

- 50 Cai, W., Qin, A., Guo, P., Yan, D., Hu, F., Yang, Q., Xu, M., Fu, Y., Zhou, J. y Tang, X. (2013). Clinical significance and functional studies of myeloid-derived suppressor cells in chronic hepatitis C patients. J. Clin. Immunol. 33, 798-808.
  - Chao, M.P., Tang, C., Pachynski, R.K., Chin, R., Majeti, R. y Weissman, I.L. (2011). Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy. Blood 118, 4890-4901.
- Chen, J., Deng, C., Shi, Q., Jiang, J., Zhang, Y., Shan, W. y Sun, W. (2013). CpG oligodeoxynucleotide induces bone marrow precursor cells into myeloid-derived suppressor cells. Mol Med Rep 8, 1149-1154.
  - Cheron, A., Floccard, B., Allaouchiche, B., Guignant, C., Poitevin, F., Malcus, C., Crozon, J., Faure, A., Guillaume, C., Marcotte, G., etal. (2010). Lack of recovery in monocyte human leukocyte antigen-DR expression is independently associated with the development of sepsis after major trauma. Crit Care 14, R208.
- 60 Cripps, J.G. y Gorham, J.D. (2011). MDSC in autoimmunity. Int. Immunopharmacol. 11, 789-793.
  Cuenca, A.G., Delano, M.J., Kelly-Scumpia, K.M., Moreno, C., Scumpia, P.O., Laface, D.M., Heyworth, P.G., Efron, P.A. y Moldawer, L.L. (2011). A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. Mol. Med. 17, 281-292.
- Diaz-Montero, C.M., Salem, M.L., Nishimura, M.I., Garrett-Mayer, E., Cole, D.J. y Montero, A.J. (2009). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. Cancer Immunol. Immunother. 58, 49-59.

- Diaz-Montero, C.M., Finke, J. y Montero, A.J. (2014). Myeloid-derived suppressor cells in cancer: therapeutic, predictive, and prognostic implications. Semin. Oncol. 41, 174-184.
- Dilek, N., van Rompaey, N., Le Moine, A. y Vanhove, B. (2010). Myeloid-derived suppressor cells in transplantation. Curr Opin Organ Transplant 15, 765-768.
- Dugast, A.-S., Haudebourg, T., Coulon, F., Heslan, M., Haspot, F., Poirier, N., Vuillefroy de Silly, R., Usal, C., Smit, H., Martinet, B., *et al.* (2008). Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. J. Immunol 180, 7898-7906.

10

45

65

- Edris, B., Weiskopf, K., Volkmer, A.K., Volkmer, J.-P., Willingham, S.B., Contreras-Trujillo, H., Liu, J., Majeti, R., West, R.B., Fletcher, J.A., *et al.* (2012). Antibody therapy targeting the CD47 protein is effective in a model of aggressive metastatic leiomyosarcoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 6656-6661.
- Gabitass, R.F., Annels, N.E., Stocken, D.D., Pandha, H.A. y Middleton, G.W. (2011). Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. Cancer Immunol. Immunother. 60, 1419-1430. Gabrilovich, D.I. y Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat. Rev. Immunol. 9, 162-174.
- Nat. Rev. Immunol. 9, 162-174.
  Gabrilovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M. y Kast, W.M. (2001). Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. J. Immunol. 166, 5398-5406.
  - Gabrilovich, D.I., Bronte, V., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S. y Schreiber, H. (2007). The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. Cancer Res. 67, 425; author reply 426. Gabrilovich, D.I., Ostrand Besenberg, S. y Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of gyaldrid cells by type and December 1.
- 20 D.I., Ostrand-Rosenberg, S. y Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nat. Rev. Immunol. 12, 253-268.
  - Garg, A. y Spector, S.A. (2014). HIV type 1 gp120-induced expansion of myeloid derived suppressor cells is dependent on interleukin 6 and suppresses immunity. J. Infect. Dis. 209, 441-451.
- Van Ginderachter, J.A., Beschin, A., De Baetselier, P. y Raes, G. (2010). Myeloid-derived suppressor cells in parasitic infections. Eur. J. Immunol. 40, 2976-2985.
  - Goh, C., Narayanan, S. y Hahn, Y.S. (2013). Myeloid-derived suppressor cells: the dark knight or the joker in viral infections? Immunol. Rev. 255, 210-221.
  - Heithoff, D.M., Enioutina, E.Y., Bareyan, D., Daynes, R.A. y Mahan, M.J. (2008). Conditions that diminish myeloid-derived suppressor cell activities stimulate cross-protective immunity. Infect. Immun. 76, 5191-5199.
- Highfill, S.L., Cui, Y., Giles, A.J., Smith, J.P., Zhang, H., Morse, E., Kaplan, R.N. y Mackall, C.L. (2014). Disruption of CXCR2-mediated MDSC tumor trafficking enhances anti-PD1 efficacy. Sci Transl Med 6, 237ra67.
  - Hock BD, McKenzie JL, Cross NB, Currie MJDynamic changes in myeloid derived suppressor cell subsets following renal transplant: A prospective study. Transpl Immunol. junio de 2015;32(3): 164-71
- Hu, X., Bardhan, K., Paschall, A.V., Yang, D., Waller, J.L., Park, M.A., Nayak-Kapoor, A., Samuel, T.A., Abrams, S.I. y Liu, K. (2013). Deregulation of Apoptotic Factors Bcl-xL and Bax Confers Apoptotic Resistance to Myeloid-derived Suppressor Cells and Contributes to Their Persistence in Cancer. J. Biol. Chem. 288, 19103-19115. Huang, A., Zhang, B., Wang, B., Zhang, F., Fan, K.-X. y Guo, Y.-J. (2013). Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. Cancer Immunol. Immunother. 62, 1439-1451.
- ldorn, M., Køllgaard, T., Kongsted, P., Sengeløv, L. y Thor Straten, P. (2014). Correlation between frequencies of blood monocytic myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and negative prognostic markers in patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. Cancer Immunol. Immunother.
  - James, B.R., Anderson, K.G., Brincks, E.L., Kucaba, T.A., Norian, L.A., Masopust, D. y Griffith, T.S. (2014). CpG-mediated modulation of MDSC contributes to the efficacy of Ad5-TRAIL therapy against renal cell carcinoma. Cancer Immunol. Immunother.
    - Janols, H., Bergenfelz, C., Allaoui, R., Larsson, A.-M., Ryden, L., Björnsson, S., Janciauskiene, S., Wullt, M., Bredberg, A. y Leandersson, K. (2014). A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. J. Leukoc. Biol.
- Janssen WJ, McPhillips KA, DickinsonMG.Linderman DJ, Morimoto K, *et al.* 2008. Surfactant proteins A andDsuppress alveolar macrophage phagocytosis via interaction with SIRPa.Am. J. Respir. Crit. Care Med. 178:158-67 Kalathil, S., Lugade, A.A., Miller, A., Iyer, R. y Thanavala, Y. (2013). Higher frequencies of GARP(+)CTLA-4(+)Foxp3(+) T regulatory cells and myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients are associated with impaired T-cell functionality. Cancer Res. 73. 2435-2444.
- Keskinov, A.A. y Shurin, M.R. (2014). Myeloid regulatory cells in tumor spreading and metastasis. Immunobiology. Khaled, Y.S., Ammori, B.J. y Elkord, E. (2013). Myeloid-derived suppressor cells in cancer: recent progress and prospects. Immunol. Cell Biol. 91, 493-502.
  - Kitano, S., Postow, M.A., Ziegler, C.G.K., Kuk, D., Panageas, K.S., Cortez, C., Rasalan, T., Adamow, M., Yuan, J., Wong, P., *et al.* (2014). Computational algorithm-driven evaluation of monocytic myeloid-derived suppressor cell frequency for prediction of clinical outcomes. Cancer Immunol Res 2, 812-821.
- 60 Kurkó, J., Vida, A., Giant, T.T., Scanzello, C.R., Katz, R.S., Nair, A., Mikecz, K. y Szekanecz, Z. (2014). Identification of myeloid-derived suppressor cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. BMC Musculoskelet Disord 15, 281.
  - Kurmaeva, E., Bhattacharya, D., Goodman, W., Omenetti, S., Merendino, A., Berney, S., Pizarro, T. y Ostanin, D.V. (2014). Immunosuppressive monocytes: possible homeostatic mechanism to restrain chronic intestinal inflammation. J. Leukoc. Biol. 96, 377-389.
- Majeti, R., Chao, M.P., Alizadeh, A.A., Pang, W.W., Jaiswal, S., Gibbs, K.D., Jr, van Rooijen, N. y Weissman, I.L.

- (2009). CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. Cell 138, 286-299.
- Makarenkova, V.P., Bansal, V., Matta, B.M., Perez, L.A. y Ochoa, J.B. (2006). CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. J. Immunol. 176, 2085-2094.
- Mao, Y., Sarhan, D., Steven, A., Seliger, B., Kiessling, R. y Lundqvist, A. (2014). Inhibition of tumor-derived prostaglandin-e2 blocks the induction of myeloid-derived suppressor cells and recovers natural killer cell activity. Clin. Cancer Res. 20, 4096-4106.
  - Milling S, Yrlid U, Cerovic V, MacPherson G. 2010. Subsets of migrating intestinal dendritic cells. Immunol. Rev. 234:259-67
- Mirza, N., Fishman, M., Fricke, I., Dunn, M., Neuger, A.M., Frost, T.J., Lush, R.M., Antonia, S. y Gabrilovich, D.I. (2006). All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. Cancer Res. 66, 9299-9307.
  - Nefedova, Y., Fishman, M., Sherman, S., Wang, X., Beg, A.A. y Gabrilovich, D.I. (2007). Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. Cancer Res. 67, 11021-11028. Ochando, L.C. y Chen, S.H. (2012). Myeloid derived suppressor cells in transplantation and cancer. Immunol. Res. 54, 275-
- 15 J.C. y Chen, S.H. (2012). Myeloid-derived suppressor cells in transplantation and cancer. Immunol. Res. 54, 275-285.
  - Oldenborg, P.A., Zheleznyak, A., Fang, Y.F., Lagenaur, C.F., Gresham, H.D. y Lindberg, F.P. (2000). Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. Science 288, 2051-2054.
- Ostrand-Rosenberg, S., Sinha, P., Chornoguz, O. y Ecker, C. (2012). Regulating the suppressors: apoptosis and inflammation govern the survival of tumor-induced myeloid-derived suppressor cells (MDSC). Cancer Immunol. Immunother. 61, 1319-1325.
  - Seiffert M, Cant C, Chen Z, Rappold I, Brugger W, et al. 1999. Human signalregulatory protein is expressed on normal, but not on subsets of leukemic myeloid cells and mediates cellular adhesion involving its counterreceptor CD47. Blood 94:3633-43
- Serafini, P. (2013). Myeloid derived suppressor cells in physiological and pathological conditions: the good, the bad, and the ugly. Immunol. Res. 57, 172-184.

30

35

60

- Shen, P., Wang, A., He, M., Wang, Q. y Zheng, S. (2014). Increased circulating Lin(-/low) CD33(+) HLA-DR(-) myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients. Hepatol. Res. 44, 639-650.
- Smith, A.R. y Reynolds, J.M. (2014). Editorial: The contribution of myeloid-derived suppression to inflammatory disease. J. Leukoc. Biol. 96, 361-364.
- Solito, S., Marigo, I., Pinton, L., Damuzzo, V., Mandruzzato, S. y Bronte, V. (2014). Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1319, 47-65.
- Srivastava, M.K., Zhu, L., Harris-White, M., Kar, U.K., Kar, U., Huang, M., Johnson, M.F., Lee, J.M., Elashoff, D., Strieter, R., *et al.* (2012a). Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. PLoS ONE 7. e40677.
- Srivastava, M.K., Dubinett, S. y Sharma, S. (2012b). Targeting MDSCs enhance therapeutic vaccination responses against lung cancer. Oncoimmunology 1, 1650-1651.
- Sui, Y., Hogg, A., Wang, Y., Frey, B., Yu, H., Xia, Z., Venzon, D., McKinnon, K., Smedley, J., Gathuka, M., *et al.* (2014). Vaccine-induced myeloid cell population dampens protective immunity to SIV. J. Clin. Invest. 124, 2538-
- 2549. Sun, H.-L., Zhou, X., Xue, Y.-F., Wang, K., Shen, Y.-F., Mao, J.-J., Guo, H.-F. y Miao, Z.-N. (2012). Increased frequency and clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal carcinoma. World J. Gastroenterol. 18, 3303-3309.
  - Talmadge, J.E. y Gabrilovich, D.I. (2013). History of myeloid-derived suppressor cells. Nat. Rev. Cancer 13, 739-752
- Taylor, J.V., Gordon, L.E. y Polk, H.C. (2000). Early decrease in surface expression of HLA-DQ predicts the development of infection in trauma patients. Clin. Exp. Immunol. 122, 308-311.
  - Tseng, D., Volkmer, J.-P., Willingham, S.B., Contreras-Trujillo, H., Fathman, J.W., Fernhoff, N.B., Seita, J., Inlay, M.A., Weiskopf, K., Miyanishi, M., *et al.* (2013). Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 11103-11108.
- Uluçkan, O., Becker, S.N., Deng, H., Zou, W., Prior, J.L., Piwnica-Worms, D., Frazier, W.A. y Weilbaecher, K.N. (2009). CD47 regulates bone mass and tumor metastasis to bone. Cancer Res. 69, 3196-3204.
  - Venet, F., Tissot, S., Debard, A.-L., Faudot, C., Crampe, C., Pachot, A., Ayala, A. y Monneret, G. (2007). Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. Crit. Care Med. 35, 1910-1917.
- Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., Martin, F., Apetoh, L., Rebe, C. y Ghiringhelli, F. (2010). 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. Cancer Res. 70, 3052-3061.
  - Vollbrecht, T., Stirner, R., Tufman, A., Roider, J., Huber, R.M., Bogner, J.R., Lechner, A., Bourquin, C. y Draenert, R. (2012). Chronic progressive HIV-1 infection is associated with elevated levels of myeloid-derived suppressor cells. AIDS 26, F31-37.
    - Wang, Y., Xu, Z., Guo, S., Zhang, L., Sharma, A., Robertson, G.P. y Huang, L. (2013). Intravenous delivery of siRNA targeting CD47 effectively inhibits melanoma tumor growth and lung metastasis. Mol. Ther. 21, 1919-1929. Weide, B., Martens, A., Zelba, H., Stutz, C., Derhovanessian, E., Di Giacomo, A.M., Maio, M., Sucker, A., Schilling, B., Schadendorf, D., et al. (2014). Myeloid-derived suppressor cells predict survival of patients with advanced
- 65 melanoma: comparison with regulatory T cells and NY-ESO-1- or melan-A-specific T cells. Clin. Cancer Res. 20, 1601-1609.

Weiskopf, K., Ring, A.M., Ho, C.C.M., Volkmer, J.-P., Levin, A.M., Volkmer, A.K., Ozkan, E., Fernhoff, N.B., van de Rijn, M., Weissman, I.L., et al. (2013). Engineered SIRPa variants as immunotherapeutic adjuvants to anticancer antibodies. Science 341, 88-91.

Whitfield-Larry, F., Felton, J., Buse, J. v Su, M.A. (2014). Myeloid-derived suppressor cells are increased in 5 frequency but not maximally suppressive in peripheral blood of Type 1 Diabetes Mellitus patients. Clin. Immunol. 153. 156-164.

Willingham, S.B., Volkmer, J.-P., Gentles, A.J., Sahoo, D., Dalerba, P., Mitra, S.S., Wang, J., Contreras-Trujillo, H., Martin, R., Cohen, J.D., et al. (2012). The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 6662-6667.

10 Ye, X.-Z., Yu, S.-C. y Bian, X.-W. (2010). Contribution of myeloid-derived suppressor cells to tumor-induced immune suppression, angiogenesis, invasion and metastasis. J Genet Genomics 37, 423-430. Youn, J.-I., Kumar, V., Collazo, M., Nefedova, Y., Condamine, T., Cheng, P., Villagra, A., Antonia, S., McCaffrey,

J.C., Fishman, M., et al. (2013). Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. Nat. Immunol. 14, 211-220.

- Zhang, B., Wang, Z., Wu, L., Zhang, M., Li, W., Ding, J., Zhu, J., Wei, H. y Zhao, K. (2013). Circulating and tumor-15 infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma. PLoS ONE 8, e57114. Zhao, X.W., van Beek, E.M., Schornagel, K., Van der Maaden, H., Van Houdt, M., Otten, M.A., Finetti, P., Van Egmond, M., Matozaki, T., Kraal, G., et al. (2011). CD47-signal regulatory protein-α (SIRPa) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 18342-18347.
- Zhu, X., Pribis, J.P., Rodriguez, P.C., Morris, S.M., Vodovotz, Y., Billiar, T.R. y Ochoa, J.B. (2014). The central role 20 of arginine catabolism in T-cell dysfunction and increased susceptibility to infection after physical injury. Ann. Surg. 259, 171-178.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

25

<110> EFFIMUNE POIRIER, Nicolas VANHOVE, Bernard

<120> MÉTODO Y COMPOSICIONES PARA INDUCIR LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SUPRESORAS DERIVADAS MIELOIDES PARA TRATAR EL CÁNCER Y LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

30 <130> VMA/sf - F2173/5/WO/PCT <150> EP 14190370.8 <151> 24/10/2014 35

<160> 10

<170> Patentln versión 3.5

40 <210> 1 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial

<220> 45 <223> Cebador

<400> 1

ccttggtcaa gcagtacagc c 21

50 <210> 2 <211> 22 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220> <223> Cebador

<400> 2

60 ttcgctgatg acacaaacat ga 22

> <210>3<211> 22 <212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

	<220> <223> Cebador	
5	<400> 3 caacaggctg gataggaaac ct	22
10	<210> 4 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
15	<400> 4 tgactacgcc agagttatac gc	22
20	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador	
	<400> 5 acagcaaaag acacccacgg	20
30	<210> 6 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador	
	<400> 6 cttgtttcat tctgagcctc etc23	
40	<210> 7 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador	
	<400> 7 tcatcaggga catcatcaaa cc	22
50	<210> 8 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador	
60	<400> 8 cgaggaacgc acctttctg 19	9
65	<210> 9 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Cebador	
5	<400> 9 ggcattgctg tcctgtgatt ac 2	22
10	<210> 10 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
15	<400> 10 ggagtagttg ttagcgatgt cgta 24	

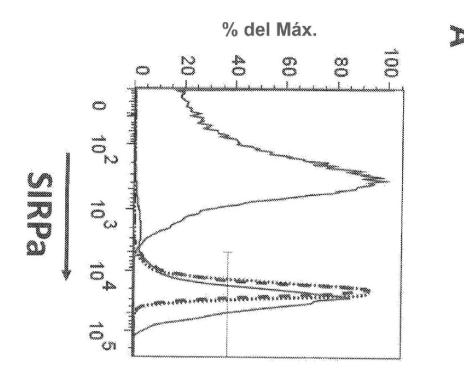
#### **REIVINDICACIONES**

- 1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo y un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína reguladora de señales alfa (SIRPa) y bloquea la interacción entre SIRPa y CD47, para su uso en el tratamiento de un carcinoma hepatocelular o un melanoma en un paciente.
- 2. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho carcinoma o melanoma hepatocelular es metastásico.
- 10 3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho compuesto se combina con un segundo agente terapéutico.

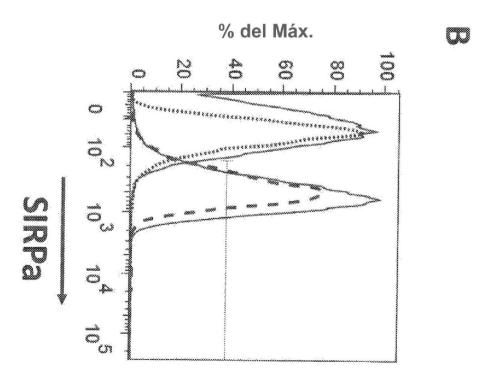
5

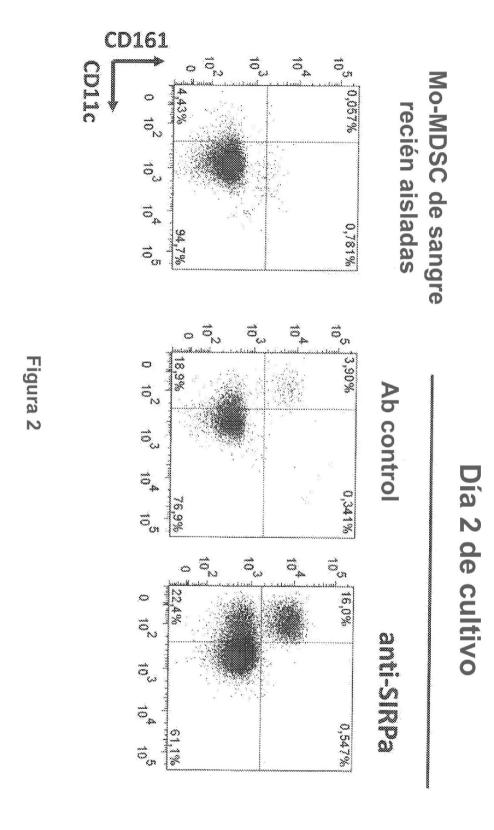
15

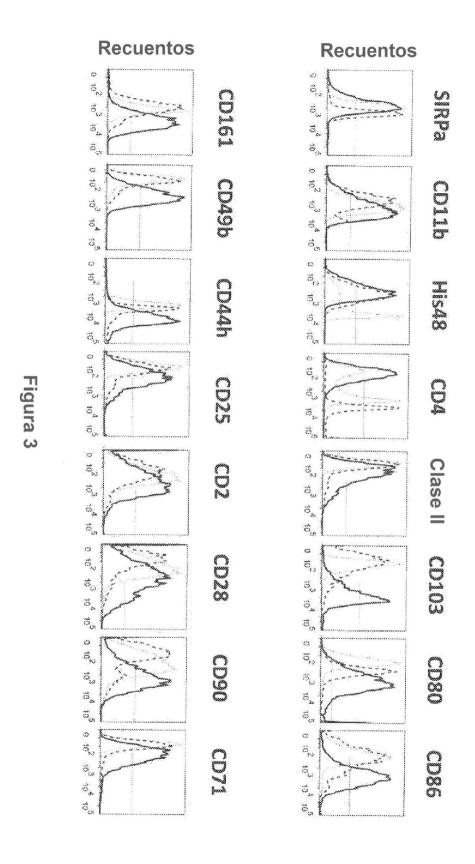
- 4. El compuesto de la reivindicación 3, para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en agentes quimioterapéuticos, radioterapia, cirugía, agentes inmunoterapéuticos, antibióticos y probióticos.
- 5. El compuesto de la reivindicación 4, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho segundo agente terapéutico es un agente inmunoterapéutico seleccionado del grupo que consiste en vacunas terapéuticas y bloqueadores o activadores de puntos de control inmunitarios.

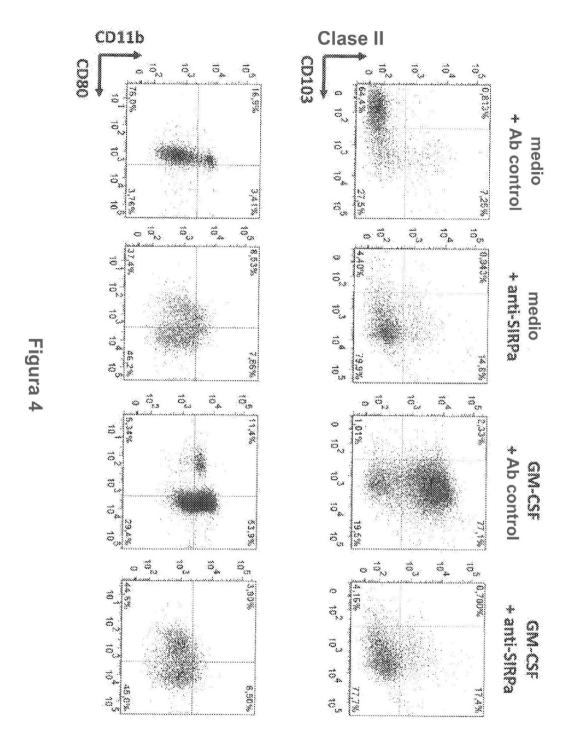












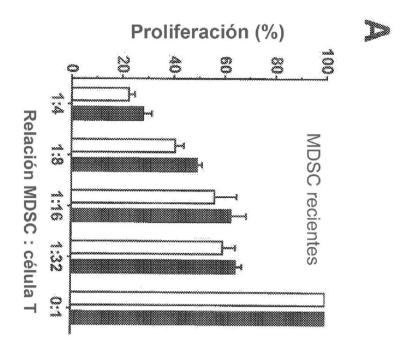
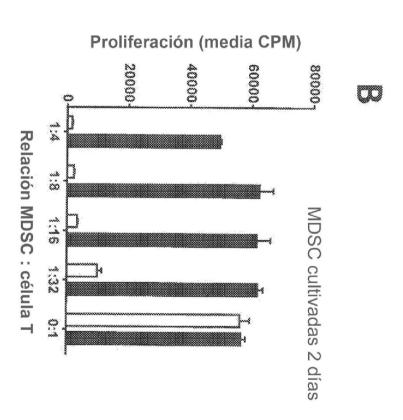


Figura 5



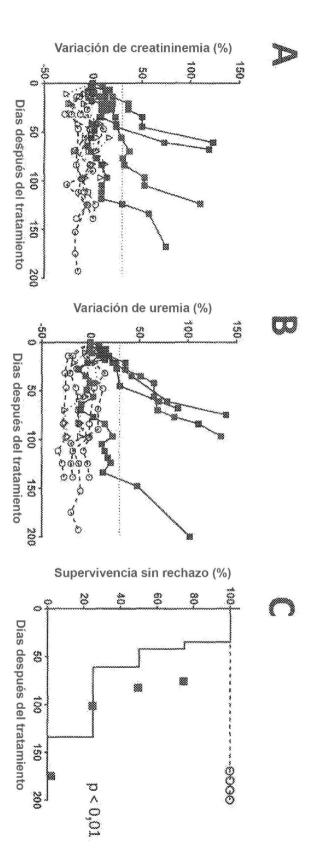
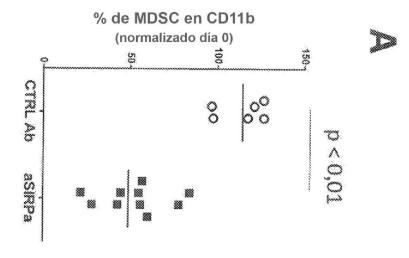
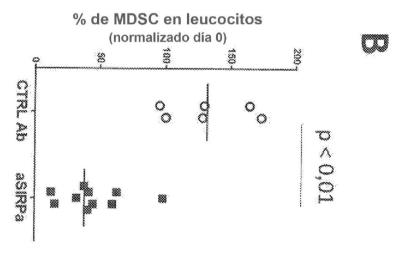


Figura 6





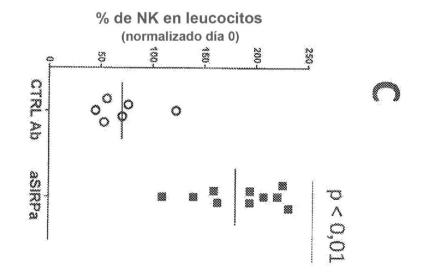
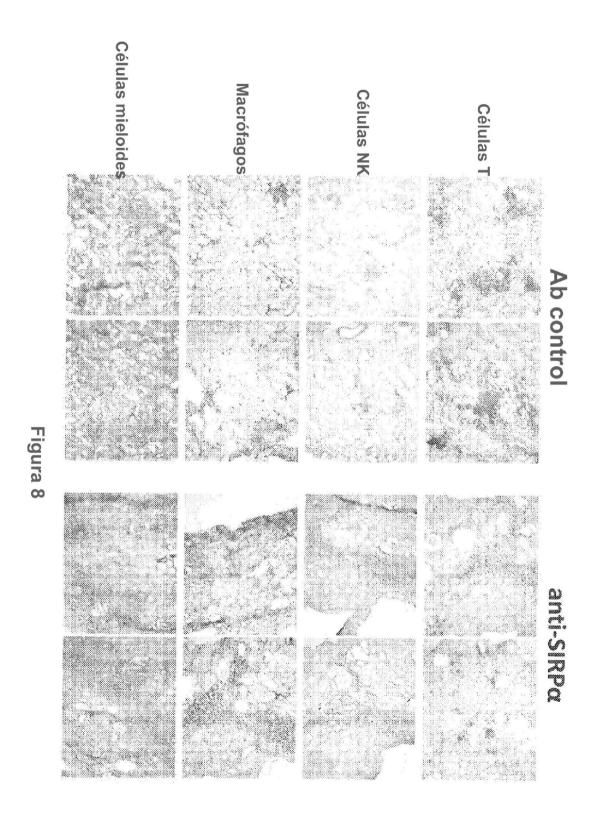
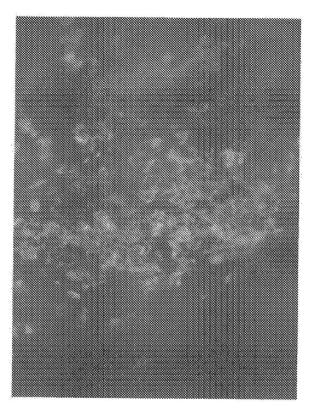
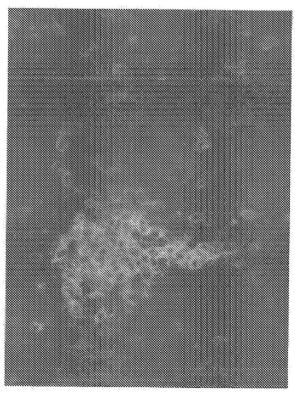


Figura 7

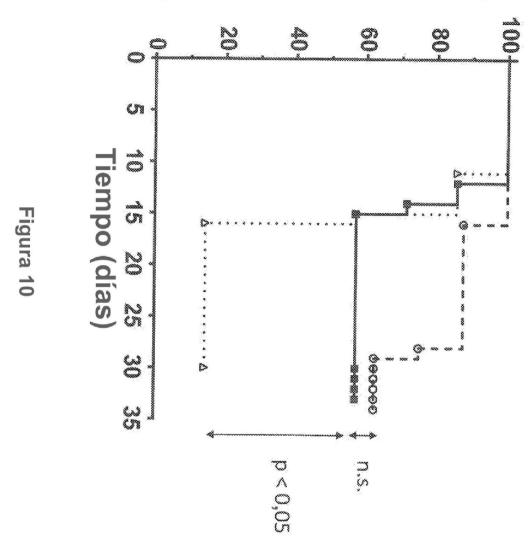


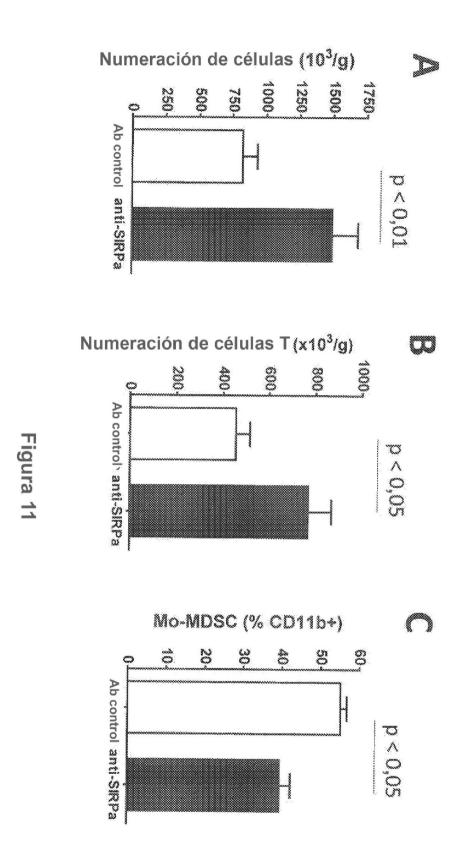


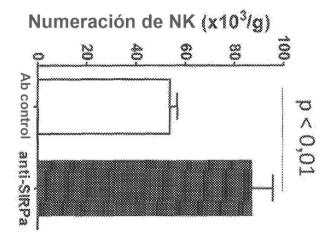




# Supervivencia en porcentaje







Fluorescencia mediana de CD27

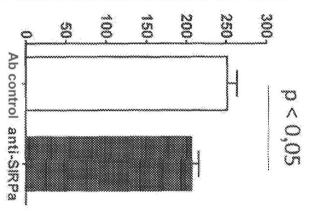
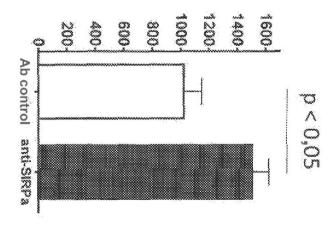
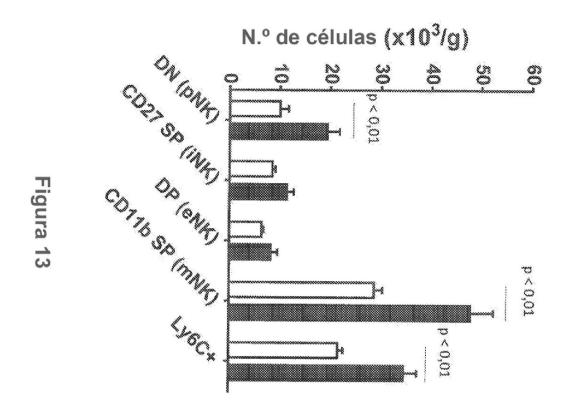
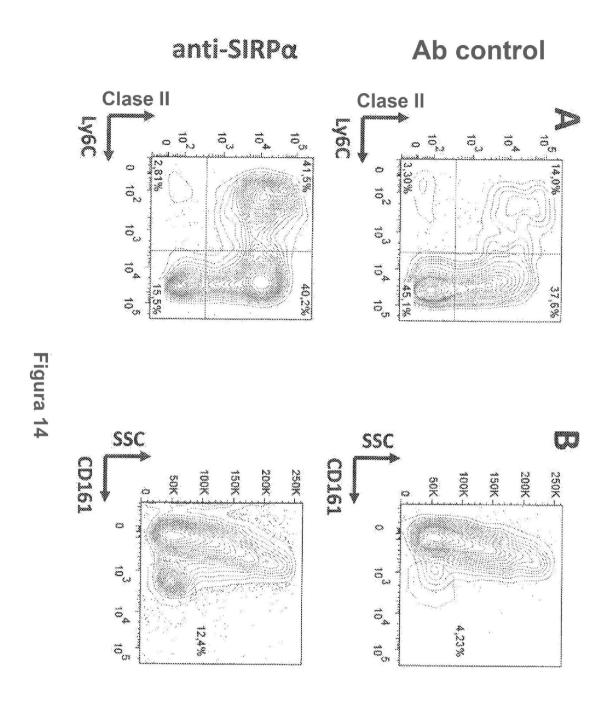


Figura 12

Fluorescencia mediana de CD11b









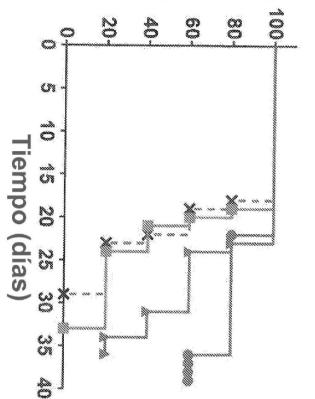


Figura 15

