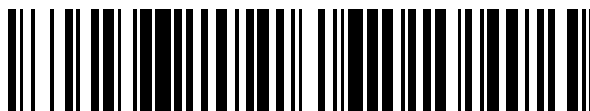


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 749**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2007 E 14197004 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2862579**

54 Título: **Inmunidad tumoral**

30 Prioridad:

04.10.2006 US 828177 P

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

14.08.2017

73 Titular/es:

**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(100.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215, US**

72 Inventor/es:

**DRANOFF, GLENN y
JINUSHI, MASAHIKA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 629 749 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

Inmunidad tumoral

5 Campo técnico

Esta invención se relaciona con oncología, y más particularmente con métodos y composiciones para el tratamiento del cáncer.

10 Antecedentes

15 El diseño de estrategias terapéuticas para estimular respuestas inmunitarias antitumorales potentes, específicas y duraderas es un objetivo central de la inmunología del cáncer. La caracterización genética y bioquímica de antígenos tumorales ha llevado al descubrimiento de que la mayoría de los pacientes con cáncer desarrollan alguna forma de respuesta inmunitaria a neoplasias en desarrollo. Sin embargo, la formación y progresión de una enfermedad clínicamente evidente implica que las reacciones endógenas son típicamente ineficaces. Dos características de la biología de células tumorales contribuyen a una respuesta antitumoral relativamente débil. En primer lugar, ya que las células tumorales se derivan de células normales, el sistema inmunológico puede no reconocer a las células tumorales como peligrosas o extrañas. En segundo lugar, las células tumorales tienden a expresar un complemento reducido de los receptores y moléculas en que el cuerpo se basa para activar las respuestas inmunitarias. El análisis de los mecanismos subyacentes al escape tumoral de la vigilancia inmunitaria ha puesto de manifiesto la ineficiencia de la presentación de antígeno tumoral mediada por células dendríticas y la regulación inmunitaria negativa como factores críticos que restringen la potencia de las respuestas del hospedero.

25 Los enfoques para estimular y potenciar la inmunidad antitumoral que están bajo evaluación clínica activa incluyen vacunas contra el cáncer contra antígenos específicos de células tumorales o células tumorales enteras, anticuerpos monoclonales, citocinas recombinantes e infusiones celulares adaptativas. Los ensayos clínicos de Fase I, II y III para evaluar estas estrategias se resumen en Hodi y Dranoff (2006); Laheru y Jaffee (2005); y Finn (2003). Los ensayos clínicos Fase III en curso para evaluar la inmunoterapia contra el cáncer se describen además en la base de datos de ensayos clínicos del Instituto Nacional del Cáncer en <http://cancer.gov/clinicaltrials>.

35 El uso de las células tumorales propias del paciente (células autólogas) para estimular la inmunidad antitumoral ha sido objeto de investigación activa durante muchos años. Esfuerzos recientes se han centrado en el desarrollo de estrategias para aumentar la eficacia de las vacunas de células tumorales autólogas. Una serie de artículos ha descubierto el potencial terapéutico de la manipulación del equilibrio de citocinas dentro del microambiente tumoral (ver, por ejemplo, Forni et al., 1988, *Cancer and Met. Reviews* 7: 289-309; Watanabe et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9456-9460; Gansbacher et al., 1990, *Cancer Res.* 50: 7820-7825; Tepper et al., 1990, *Cell* 60: 503-512; Fearon et al., 1990, *Cell* 60: 397-403; Colombo et al., 1991, *J. Exptl. Med.*, 173: 889-897; Hock et al., 1991, *J. Exptl. Med.*, 174: 1291-1298; Rollins et al., 1991, *Mol. Cell Biol.*, 11: 3125-3131; Teng et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3535-3539). Investigaciones relevantes que implicaron un análisis comparativo de las capacidades relativas de múltiples moléculas inmunoestimuladoras para potenciar las respuestas del hospedero después de la transferencia de genes a las células tumorales identificó el GM-CSF como el más potente de 33 productos probados (Dranoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3539-3543; patente de Estados Unidos núm. 5,904,920; Dranoff, 2002, *Immunol. Rev.* 188: 147-154).

45 La capacidad de células tumorales autólogas que han sido modificadas genéticamente para expresar GM-CSF de estimular una respuesta antitumoral a pacientes con cáncer humano ha sido el objeto de una serie de ensayos clínicos. Una variedad de indicadores clínicos de una respuesta antitumoral, por ejemplo, aumento del tiempo de supervivencia, necrosis tumoral, regresión tumoral, infiltración tumoral por linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, presencia de alto título de anticuerpos contra antígenos tumorales en sueros post-inmunización y la destrucción selectiva de la vasculatura tumoral, ha sido reportada en ensayos clínicos en pacientes que sufren de melanoma metastásico (Soiffer et al., 1997, *Hum. Gene Ther.* 8: 111-123; Soiffer et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 13141-13146; Soiffer et al., 2003, *J. Clin. Oncol.* 21: 3343-3350); carcinoma de pulmón de células no pequeñas (Salgia et al., 2003, *J. Clin. Oncol.*, 21:624-630; Nemunaitis et al., 2004, *J. Natl. Cancer Inst.*, 96: 326-331); carcinoma de células renales (Simons et al., 1997, *Cancer Res.*, 57: 1537-1546; Tani et al, 2004, *Mol. Ther.* 10: 799-816.); y carcinoma de próstata (Simons et al., 1999, *Cancer Res.* 59: 5160-5168). Los resultados de los ensayos clínicos establecieron que la vacunación con células tumorales autólogas mejoró consistentemente la inmunidad antitumoral en pacientes con cáncer avanzado. Sin embargo, debido a que la mayoría de los pacientes aun así sucumbieron a la progresión de la enfermedad, hay una necesidad continua de vacunas antitumorales eficaces y potentes. El documento WO 95/15171 describe un polipéptido que tiene la especificidad de unión al anticuerpo del antígeno HMFG de 46 Kdalton y su uso en el tratamiento del cáncer. El documento WO 01/68709 describe anticuerpos monoclonales que se unen a fosfatidilserina y su uso en un método para promover una respuesta inmunitaria terapéutica contra el cáncer. El documento WO 00/02584 describe anticuerpos contra aminofosfolípidos y su uso para inducir la destrucción de los vasos sanguíneos tumorales y necrosis tumoral.

65 Resumen

Se describen métodos y composiciones para la terapia del cáncer. En particular, los métodos y composiciones descritos en la presente descripción estimulan la destrucción del tumor mediada por el sistema inmunitario. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las condiciones que dan lugar a la regulación negativa del MFG-E8 pueden potenciar la destrucción tumoral estimulada por GM-CSF para provocar una respuesta antitumoral clínica.

El MFG-E8 se expresa en una serie de tejidos que incluyen glándula mamaria, músculo liso aórtico, sangre y células hematopoyéticas, cerebro, corazón, pulmón, riñón, bazo, páncreas, ovario y piel. Se han encontrado niveles elevados de MFG-E8 en los sueros de pacientes con cáncer de mama metastásico y en líneas celulares de carcinoma de mama y glioma.

El MFG-E8 está íntimamente involucrado en la apoptosis, el mecanismo principal del cuerpo para eliminar células no deseadas o potencialmente dañinas. La apoptosis, o muerte celular programada, es esencial para la renovación tisular, la selección de células inmunitarias y la aniquilación de células tumorales o infectadas por virus. La eliminación rápida de células apoptóticas por los fagocitos, por ejemplo, macrófagos y células dendríticas inmaduras, impide la liberación de material intracelular potencialmente tóxico o inmunogénico de los cadáveres de células muertas. El MFG-E8 promueve el englobamiento fagocítico de las células apoptóticas, al funcionar como una molécula puente entre la célula moribunda y el fagocito.

En consecuencia, la invención se define de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Se describe además un método para tratar un cáncer o síntoma de cáncer en un sujeto. El método puede incluir administrar al sujeto una cantidad eficaz de uno o más antígenos de células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria contra un tumor y un inhibidor de MFG-E8. El método puede incluir además administrar una composición que comprende una cantidad eficaz de uno o más antígenos de células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria contra un tumor y un inhibidor de MFG-E8. El método puede incluir administrar una primera composición que comprende una cantidad eficaz de uno o más antígenos de células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria contra un tumor y administrar una segunda composición que comprende una cantidad eficaz de un inhibidor de MFG-E8. La etapa de administrar una cantidad eficaz de uno o más antígenos de células tumorales puede incluir la administración de células tumorales autólogas. Las células tumorales autólogas pueden expresar GM-CSF. Las células tumorales autólogas pueden portar ADN recombinante que codifica para GM-CSF. Las células tumorales autólogas pueden ser incapaces de proliferar. Las células tumorales autólogas pueden haber sido irradiadas. La cantidad eficaz de uno o más antígenos de células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria contra un tumor y un inhibidor de MFG-E8 pueden administrarse por inyección, infusión o inhalación.

En una modalidad, el inhibidor de MFG-E8 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-MFG-E8, un anticuerpo anti-fosfatidilserina, un polipéptido MFG-E8 que carece de la capacidad de unirse a integrinas; y un polipéptido MFG-E8 que carece de la capacidad de unirse a fosfatidilserina. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento Fab, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de cadena sencilla. Independientemente de la forma molecular precisa del anticuerpo, el anticuerpo es un anticuerpo farmacéuticamente puro.

En otro aspecto de la descripción, el método incluye administrar al sujeto una célula que expresa GM-CSF. La célula que expresa GM-CSF puede secretar GM-CSF. La célula que expresa GM-CSF puede ser una línea celular modificada genéticamente para expresar GM-CSF. La célula que expresa GM-CSF puede portar ADN recombinante que codifica para GM-CSF. La línea celular que expresa GM-CSF puede ser la K562. La célula que expresa GM-CSF puede ser incapaz de proliferar. La célula que expresa GM-CSF puede haber sido irradiada. En otro aspecto, el método puede incluir administrar GM-CSF al sujeto. En otro aspecto, el método puede incluir administrar al sujeto un anticuerpo anti-CTLA-4.

El cáncer puede o no expresar niveles elevados de MFG-E8 y puede seleccionarse del grupo que consiste en melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de colon y leucemia.

Los métodos y composiciones incluyen además la administración al sujeto de una terapéutica convencional contra el cáncer. La terapéutica convencional contra el cáncer es al menos quimioterapia, inmunoterapia, ablación hormonal o cirugía. En un aspecto, la terapéutica convencional contra el cáncer puede ser un inhibidor de la angiogénesis. Ejemplos de inhibidores de angiogénesis incluyen agentes que bloquean la función del factor de crecimiento del endotelial vascular (VEGF) tal como Bevacizumab (Avastin®, Genentech, Inc.). Otros ejemplos incluyen, sin limitación, Dalteparina (Fragmin®), Suramin ABT-510, Fosfato de Combretastatina A4, Lenalidomida, LY317615 (Enzastaurina), Isoflavona de Soya (Genisteína, Proteína de Soya Aislada) AMG-706, anticuerpo anti-VEGF, AZD2171, Bay 43-9006 (tosilato de Sorafenib), PI-88, PTK787/ZK 222584 (Vatalanib), SU11248 (malato de sunitinib), VEGF-Trap, XL184, ZD6474, Talidomida, ATN-161, EMD 121974 (Cilenigtida) y Celecoxib (Celebrex®).

Se proporcionan además composiciones que comprenden uno o más antígenos de células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria contra un tumor y un inhibidor de MFG-E8. La composición puede incluir células tumorales autólogas que expresen uno o más antígenos de células tumorales. Las células tumorales autólogas pueden expresar

GM-CSF. Las células tumorales autólogas pueden portar ADN recombinante que codifica para GM-CSF. Las células tumorales autólogas pueden ser incapaces de proliferar. Las células tumorales autólogas pueden haber sido irradiadas.

5 En otro aspecto, el inhibidor de MFG-E8 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-MFG-E8, un anticuerpo anti-fosfatidilserina, un polipéptido MFG-E8 que carece de la capacidad para unirse a integrinas; y un polipéptido MFG-E8 que carece de la capacidad de unirse a fosfatidilserina. La composición puede incluir una célula que expresa GM-CSF. La célula que expresa GM-CSF puede secretar GMCSF. La célula que expresa GM-CSF puede ser una línea celular modificada genéticamente para expresar GMCSF. La célula que expresa GM-CSF puede portar ADN recombinante que codifica para GMCSF. La línea celular puede ser la K562. La célula que expresa GM-CSF puede ser incapaz de proliferar. La célula que expresa GM-CSF puede haber sido irradiada. En otro aspecto, la composición puede incluir GM-CSF. La composición puede incluir un portador farmacéuticamente aceptable.

10 En otro aspecto, la composición puede incluir una terapéutica convencional contra el cáncer. La terapéutica convencional contra el cáncer puede ser un inhibidor de la angiogénesis. El inhibidor de la angiogénesis puede inhibir la actividad del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

15 Los detalles de una o más modalidades de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción más adelante. Otras características, objetos, y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

20 Descripción de los dibujos

25 La Figura 1 representa los resultados de un experimento que demuestra que el GM-CSF regula la fagocitosis de células apoptóticas. (A) Se añadieron células entradas en apoptosis por dexametasona o etopósido o en necrosis mediante congelación-descongelación, a macrófagos peritoneales CD11b⁺ de tipo silvestre o deficientes en GM-CSF y la eficiencia de la ingestión se midió por citometría de flujo. (B) Las células dendríticas CD11c⁺ de tipo silvestre o deficientes en GM-CSF aisladas del bazo o generadas a partir del cultivo de precursores de médula ósea con Flt3-L fueron expuestas a timocitos apoptóticos marcados y la fagocitosis se determinó por citometría de flujo. (C) Macrófagos peritoneales de tipo silvestre, deficientes en GM-CSF/IL-3 o GM-CSF/IL-3/IFN- γ (tres ratones por grupo) fueron expuestos a timocitos apoptóticos o necróticos durante dos horas y los sobrenadantes de cultivo fueron medidos para TGF IL-1, IL-6, IL-12p70 e IL-23p19 mediante ELISA. No se observaron diferencias significativas en la producción de IL-10 o TNF- α (no mostrado). (D) Los macrófagos peritoneales de tipo silvestre o deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ se cargaron con timocitos apoptóticos o necróticos durante dos horas y después se co-cultivaron con esplenocitos Balb/c de tipo silvestre durante 72 horas. La proliferación se determinó mediante la captación de ³H-timidina. Los resultados son representativos de dos o tres experimentos independientes.

35 La Figura 2 representa los resultados de un experimento que demuestra que el GM-CSF regula la captación de células apoptóticas mediada por MFG-E8. (A) Se aislaron macrófagos de tipo silvestre o deficientes en GM-CSF de la cavidad peritoneal, hígado, bazo y lavado broncoalveolar, fueron expuestos a células apoptóticas durante la noche y la expresión de MFG-E8 se determinó por citometría de flujo. (B) Las células dendríticas esplénicas o derivadas de médula ósea generadas en presencia de Flt3-L de tipo silvestre o deficientes en GM-CSF fueron expuestas a células apoptóticas durante la noche y teñidas para MFG-E8. (C) Los macrófagos peritoneales de tipo silvestre o deficientes en GM-CSF se transdujeron con vectores retrovirales que codifican MFG-E8, el mutante de RGE, o GFP y se evaluaron para la fagocitosis de timocitos apoptóticos marcados. (D) Macrófagos peritoneales de tipo silvestre, deficientes en GM-CSF/IL-3 o GM-CSF/IL-3/IFN- γ , modificados genéticamente para expresar MFG-E8, el mutante de RGE o GFP (cuatro ratones por grupo) fueron expuestos a timocitos apoptóticos y el sobrenadante de cultivo fue analizado para la producción de citocinas mediante ELISA. (E) Los macrófagos peritoneales de tipo silvestre o deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ modificados genéticamente para expresar MFG-E8, el mutante de RGE o GFP, fueron expuestos a timocitos apoptóticos durante dos horas y después co-cultivados durante 72 horas con esplenocitos Balb/c de tipo silvestre, con o sin anticuerpos neutralizantes de TGF- β . La proliferación se determinó mediante la captación de ³H-timidina. Los resultados son representativos de dos a cuatro experimentos independientes.

40 La Figura 3 representa los resultados de un experimento que demuestra que el GM-CSF contribuye a la homeostasis de Treg a través de MFG-E8. (A) Los macrófagos peritoneales de tipo silvestre o deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ modificados genéticamente para expresar MFG-E8, el mutante RGE o GFP fueron expuestos a timocitos apoptóticos durante dos horas y después co-cultivados durante 72 horas con esplenocitos singénicos tipo silvestre. Las Tregs que expresan FoxP3 fueron analizadas por citometría de flujo. (B) Se añadieron anticuerpos de bloqueo a TGF- β y MHC clase II o isotipo de control al co-cultivo de macrófagos cargados de células apoptóticas y esplenocitos singénicos. (C) Los sobrenadantes de cultivo de macrófagos expuestos a células apoptóticas se ensayaron para determinar la actividad quimiotáctica contra células T CD4⁺25⁺ y CD4⁺CD25⁻. Se añadieron anticuerpos de bloqueo contra CCL22 o isotipo de control según se indica. (D) Se analizaron los esplenocitos de ratones de tipo silvestre, deficientes en GM-CSF/IL-3 o GM-CSF/IL-3/IFN- γ para la expresión de CD4, CD25 y FoxP3. Los resultados son representativos de dos a cinco experimentos.

65 La Figura 4 representa los resultados de un experimento que demuestra que el GM-CSF regula células T efectoras CD4⁺ a través de MFG-E8. (A) Los macrófagos peritoneales de tipo silvestre, deficientes en GM-CSF/IL-3 o GM-CSF/IL-

3/IFN- γ fueron expuestos a timocitos apoptóticos durante dos horas y co-cultivados durante 72 horas con células T vírgenes singénicas de tipo silvestre CD3⁺CD45RA⁺CD62^{hi}. Las células T se analizaron después para la producción de IL-17 e IFN- γ . (B) Las células dendríticas derivadas de médula ósea generadas en presencia de Flt3-L de tipo silvestre, deficientes en GM-CSF o GM-CSF/IFN- γ , se expusieron a timocitos apoptóticos durante dos horas y se usaron para estimular células T vírgenes singénicas de tipo silvestre. (C) Los macrófagos de tipo silvestre o deficientes en IFN- γ modificados genéticamente para expresar el mutante RGE o GFP se expusieron a timocitos apoptóticos durante dos horas y se usaron para estimular células T vírgenes singénicas de tipo silvestre. (D). Los esplenocitos de ratones de tipo silvestre, deficientes en GM-CSF o GM-CSF/IFN- γ fueron estimulados con PMA e ionomicina. Se muestra la producción de citocinas para las células CD3⁺CD4⁺ seleccionadas. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos.

La Figura 5 representa los resultados de un experimento que demuestra que la reconstitución de MFG-E8 restaura la homeostasis in vivo de células T CD4⁺. (A) Los macrófagos peritoneales recuperados dos meses después del trasplante con médula ósea transducida con GFP, MFG-E8, o RGE (cinco ratones por grupo) se ensayaron para la fagocitosis de timocitos apoptóticos marcados con TAMRA. (B) Niveles de citocinas medidos mediante ELISA en sueros obtenidos dos meses después del trasplante (n=4). (C) Los esplenocitos (n=4) se cosecharon dos meses después del trasplante y se ensayaron para la expresión de FoxP3 e (D) IL-17 e IFN- γ . Se muestra la producción de citocinas para las células CD3⁺CD4⁺ seleccionadas. (E) Los macrófagos peritoneales de ratones trasplantados se cargaron con células apoptóticas y se usaron para estimular esplenocitos alogénicos Balb/c. La proliferación se determinó mediante la captación de ³H-timidina. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos de trasplante independientes.

La Figura 6 representa los resultados de un experimento que demuestra que la expresión de MFG-E8 es regulada negativamente tras la maduración de las células presentadoras de antígeno. (A) Los macrófagos peritoneales de tipo silvestre fueron expuestos a células apoptóticas y se determinó la expresión de peptidoglicano (TLR2), poli-IC (TLR3), LPS (TLR) o CpG (TLR9) y MFG-E8. (B) Los macrófagos peritoneales de tipo silvestre fueron modificados genéticamente para expresar MFG-E8 o GFP y fueron expuestos a células apoptóticas con o sin LPS. Los sobrenadantes de cultivo se ensayaron para la producción de TGF- β e IL-6 con ELISA. (C) Los macrófagos peritoneales que expresaron MFG-E8 o GFP se expusieron a células apoptóticas con o sin LPS y se co-cultivaron con esplenocitos Balb/c alogénicos. La proliferación se determinó mediante la captación de ³H-timidina. (D) Se ensayaron células dendríticas derivadas de médula ósea generadas en presencia de Flt3-L o GM-CSF para la expresión de B220 y MFG-E8. Se añadió LPS o células necróticas inducidas por congelación-descongelación donde se indica. (E) Las células dendríticas derivadas de Flt3-L se clasificaron en poblaciones B220⁺ y B220⁻, se expusieron a células apoptóticas o necróticas, y se ensayaron para la producción de TGF- β e IFN- α mediante ELISA. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes.

La Figura 7 representa los resultados de un experimento que demuestra que MFG-E8 modula la actividad de vacunación de células B16 irradiadas secretoras de GM-CSF. (A) Los ratones C57Bl/6 de tipo silvestre se vacunaron subcutáneamente con 1×10^6 células B16 irradiadas como se indica y se desafiaron al séptimo día con 1×10^6 células vivas B16 (8 ratones por grupo). (B) Se inyectaron ratones C57Bl/6 con 1×10^6 células B16 vivas y se administraron las vacunas como se indica en los días 0, 7 y 14 (8 ratones por grupo). (C) Los linfocitos infiltrantes de tumores se cosecharon de los sitios de desafío B16 de ratones tratados con las vacunas indicadas y se analizaron para células T CD4⁺ que expresan FoxP3. Los resultados son representativos de cinco experimentos. (D) Los linfocitos infiltrantes del tumor se analizaron para células T CD4⁺ que expresan FoxP3 y activación de células T CD8⁺. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos. (E) Se analizaron los linfocitos infiltrantes de tumores para la producción de IFN- γ TRP-2 específico con un ELISPOT. (F). Aspecto macroscópico de los tumores de desafío B16 en ratones tratados con las vacunas indicadas (8 ratones para B16-GM-CSF y B16-GM-CSF/MFG-E8 y 2 ratones para B16-GM-CSF/RGE).

La Figura 8 representa los resultados de un experimento que demuestra que los macrófagos deficientes en GM-CSF muestran una expresión reducida de múltiples productos génicos implicados en la captación mediada por fosfatidilserina de células apoptóticas. Los macrófagos peritoneales de tipo silvestre o deficientes en GM-CSF se expusieron a células apoptóticas y después se ensayaron para la expresión de $\alpha\beta_5$, Mer y Gas-6. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos.

La Figura 9 representa los resultados de un experimento que demuestra que el GM-CSF regula la homeostasis periférica de los Tregs. Se analizaron los ganglios linfáticos y timo de tipo silvestre o deficientes en GM-CSF para las células T CD4⁺ que expresan FoxP3. Se muestran las células T CD3⁺ seleccionadas. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos.

La Figura 10 representa los resultados de un experimento que demuestra que las células CD4⁺CD25⁺ deficientes en GM-CSF muestran una actividad supresora reducida. Las células T CD4⁺CD25⁺ se purificaron a partir de los bazo de ratones de tipo silvestre y deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ y se ensayaron para la supresión de la proliferación de células T CD4⁺CD25⁻ estimulada por anti-CD3. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos.

La Figura 11 representa un modelo de las funciones duales del GM-CSF en la tolerancia e inmunidad protectora.

La Figura 12 representa la secuencia de aminoácidos del MFG-E8 humano (número de Genbank NM_005928, GI: 5174556) que muestra las ubicaciones de los dominios de EGF y C y el motivo RGD.

La Figura 13 representa los resultados de estudios que muestran que el GM-CSF regula in vivo la expresión de MFG-E8 en estado estacionario en células presentadoras de antígeno. La tinción de anti-MFG-E8 se detectó en los macrófagos del centro germinal y los macrófagos alveolares pulmonares de tipo silvestre, pero no en ratones deficientes en GM-CSF. El material eosinofílico en los alvéolos de ratones deficientes en GM-CSF es surfactante pulmonar. Aumento original 25 X para los bazos, 250 X para los pulmones.

La Figura 14 representa los resultados de un estudio que muestra que el GM-CSF regula la expresión de MFG-E8 en macrófagos de múltiples tejidos. Se purificaron macrófagos de timo, bazo, hígado y pulmón, y se determinó la expresión de MFG-E8 mediante citometría de flujo.

La Figura 15 representa los resultados de un estudio que muestra que MFG-E8 regula la ingestión de células apoptóticas por los macrófagos en un modo dependiente de GM-CSF. Los macrófagos peritoneales marcados con fluorescencia verde se co-cultivaron con timocitos apoptóticos de tipo silvestre marcados con fluorescencia roja (tratados con dexametasona). El englobamiento de las células apoptóticas se visualizó con microscopía de fluorescencia, aumento 200 X.

La Figura 16 representa los resultados de un estudio que muestra que el MFG-E8 se expresa en macrófagos asociados a tumores en melanomas humanos. Aumento original 100 X, inserto 250 X.

Descripción detallada

La mezcla de citocinas producida en el microambiente tumoral juega un papel decisivo en la determinación del resultado de la reacción antitumoral del hospedero. La citocina factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) potencia la protección contra tumores. Los experimentos descritos en los ejemplos indican que se requiere GM-CSF para la expresión del glóbulo de grasa de la leche EGF 8 (MFG-E8) en células presentadoras de antígeno y que la fagocitosis mediada por MFG-E8 de células apoptóticas es un determinante clave de la tolerancia e inmunidad desencadenada por GM-CSF. Los experimentos descritos más adelante demuestran que las condiciones que inhiben la actividad de MFG-E8 potencian la destrucción tumoral estimulada por GM-CSF.

Se describen en la presente descripción materiales y métodos relacionados con la producción y uso de composiciones moduladoras de MFG-E8 para el tratamiento, inhibición y manejo de enfermedades y trastornos asociados con el cáncer, así como el tratamiento, inhibición y manejo de los síntomas de tales enfermedades y trastornos. En algunas modalidades, la composición moduladora de MFG-E8 incluye una o más formas mutantes de MFG-E8 que carecen de la capacidad de unirse a uno o más ligandos de MFG-E8. En algunas modalidades, las composiciones moduladoras de MFG-E8 pueden administrarse junto con, después o antes de otras inmunoterapias, por ejemplo, la vacunación con células tumorales autólogas. En algunas modalidades, las células tumorales autólogas expresan GM-CSF. Alternativamente, o adicionalmente, la composición moduladora de MFG-E8 puede incluir una célula adicional que expresa GM-CSF. Tales métodos pueden usarse para potenciar tanto la inmunoterapia clínica como las terapias convencionales contra el cáncer.

Composiciones moduladoras de MFG-E8

En la presente descripción se proporcionan composiciones moduladoras de MFG-E8. Como se usa en la presente descripción, el término "modulación" se refiere a un aumento o disminución en el nivel de actividad de MFG-E8 con respecto a la actividad de MFG-E8 en una muestra biológica que no ha sido expuesta al modulador MFG-E8. El cambio en la actividad puede causarse por una alteración en el nivel del polipéptido MFG-E8 o por una alteración en una o más actividades biológicas de MFG-E8. Por ejemplo, como se describe con mayor detalle más adelante, un inhibidor de MFG-E8 puede ser un agente que interfiere con la unión de MFG-E8 a una integrina (por ejemplo, $\alpha\beta3$ y/o $\alpha\beta5$) o interfiere con la unión de MFG-E8 a la fosfatidilserina expresada en la superficie de una célula.

El MFG-E8 (también conocido como antígeno epitelial mamario BA46, lactadherina, HMFG, MFGM, Medin, EDIL1, OAcGD3S, HsT19888 y SED1) es una glicoproteína que se encuentra tanto en la forma asociada a membrana periférica como en la secretada. El MFG-E8 se expresa en una serie de tejidos que incluyen glándula mamaria, músculo liso aórtico, sangre y células hematopoyéticas, cerebro, corazón, pulmón, riñón, bazo, páncreas, ovario y piel. Se han encontrado niveles elevados de MFG-E8 en los sueros de pacientes con cáncer de mama metastásico y en líneas celulares de carcinoma de mama y glioma. Las secuencias de ADNc y de aminoácidos que codifican un polipéptido humano MFG-E8 representativo (número de Genbank NM_005928, GI: 5174556) se muestran en los Ejemplos 14 y 15, respectivamente. Otras formas representativas de MFG-E8 tienen una secuencia de aminoácidos que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 10 o más cambios de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos del número de Genbank NM_005928, GI: 5174556). Otras secuencias de aminoácidos que se han identificado para MFG-E8 incluyen, por ejemplo, sin limitación, NP_005919, GI: 5174557; Q08431 GI: 2506380; AAC50549, GI: 1381162; y AAH03610, GI: 13177648.

El polipéptido MFG-E8 incluye dos dominios repetidos similares al EGF en el lado N-terminal y dos dominios C (similar a la discoidina) repetidos homólogos a los dominios C1 y C2 de los factores V y VIII de coagulación sanguínea. El

segundo dominio similar al EGF de MFG-E8 contiene un motivo de secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) de unión a integrina, que se conserva en todas las secuencias conocidas de MFG-E8. El motivo RGD de MFG-E8 se une fuertemente a las integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$. Las proteínas MFG-E8 también se unen a fosfolípidos aniónicos, especialmente fosfatidilserina (PS). La unión de PS a MFG-E8 parece estar mediada a través del segundo dominio C (dominio C2), de la misma manera que la de los factores V y VIII de coagulación sanguínea. Las ubicaciones de los dominios EGF y C y el motivo RGD se muestran en la Figura 12.

El MFG-E8 está íntimamente involucrado en la apoptosis, el mecanismo principal del cuerpo para eliminar células no deseadas o potencialmente dañinas. La apoptosis, o muerte celular programada, es esencial para la renovación tisular, la selección de células inmunitarias y la aniquilación de células tumorales o infectadas por virus. La eliminación rápida de células apoptóticas por fagocitos, por ejemplo, macrófagos y células dendríticas inmaduras, impide la liberación de material intracelular potencialmente tóxico o inmunogénico de cadáveres de células muertas. El MFG-E8 promueve el englobamiento fagocítico de las células apoptóticas, al funcionar como una molécula puente entre la célula moribunda y el fagocito. A través de su dominio C2, el MFG-E8 se une específicamente a la fosfatidilserina (PS) sobre la superficie de la célula moribunda; a través de su motivo RGD N-terminal, el MFG-E8 se une específicamente a las integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ en la superficie del fagocito y, de esta forma entrega la célula moribunda al fagocito para su destrucción.

Una composición moduladora de MFG-E8 puede incluir cualquier agente que altere específicamente la capacidad de MFG-E8 de actuar como una molécula puente entre la célula apoptótica y el fagocito, es decir, cualquier agente que altere la unión del MFG-E8 a sus ligandos, las integrinas $\alpha\beta 3$ y PS.

Polipéptidos MFG-E8

Un modulador MFG-E8 puede ser una forma mutante de MFG-E8 que carece o carece sustancialmente de la actividad de unión al ligando de MFG-E8. Por ejemplo, un modulador MFG-E8 puede ser una forma mutante del polipéptido MFG-E8 que carece o carece sustancialmente de la capacidad de unirse a las integrinas fagocíticas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$, mientras retiene la capacidad de unirse a PS. Dicha forma mutante de MFG-E8 funciona como un mutante negativo dominante, es decir, un mutante que afecta negativamente la función del producto génico de tipo silvestre normal dentro de la misma célula. Por lo tanto, un polipéptido MFG-E8 que contiene una mutación que anula la unión a la integrina puede opsonizar eficientemente las células apoptóticas, pero no puede entregarlas al fagocito. Además, si se administra en cantidades suficientes, la forma mutante puede ocupar todo o casi todo el PS disponible en las células apoptóticas y de esta manera impedir cualquier unión por la forma de tipo silvestre. La actividad de MFG-E8 se reducirá, lo que afecta la eliminación fagocítica de las células apoptóticas.

Se puede usar cualquier mutación que disminuya la unión específica entre MFG-E8 y las integrinas fagocíticas sin alterar la unión de MFG-E8 a PS. Las mutaciones que alteran la unión a las integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ son bien conocidas en la técnica. (ver, por ejemplo, Integrins in drug targeting-RGD templates in toxins. Lu et al. Curr Pharm Des. 2006;12(22):2749-69; Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting. Meyer et al. Curr Pharm Dcs. 2006;12(22):2723-47) Una mutación altamente adecuada es aquella que convierte la secuencia RGD N-terminal de MFG-E8 en una secuencia RGE, aunque puede usarse cualquier combinación de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 y más mutaciones en la secuencia de aminoácidos siempre que el polipéptido MFG-E8 mutante resultante retenga la actividad de unión a PS. La actividad de unión a la integrina en un MFG-E8 mutante puede reducirse en al menos 10 por ciento, por ejemplo, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o más del 90 por ciento, en comparación con la capacidad de unión a la integrina en el polipéptido MFG-E8 de tipo silvestre.

Alternativamente, una composición moduladora de MFG-E8 puede ser una forma mutante del polipéptido MFG-E8 que carece o carece sustancialmente de la capacidad de unirse a PS, mientras retiene la capacidad de unirse a integrinas fagocíticas. Tales formas mutantes pueden unirse eficientemente a los fagocitos, pero son incapaces de opsonizar las células apoptóticas. Si se administra a un nivel suficiente, la forma mutante puede ocupar toda o casi toda la integrina $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ disponible sobre las células apoptóticas relevantes y de esta manera impedir sustancialmente la unión por la forma de tipo silvestre. La actividad de MFG-E8 se reducirá, lo que afecta la eliminación fagocítica de las células apoptóticas. Las mutaciones que alteran la unión a PS sin alterar la unión a las integrinas incluyen, pero no se limitan a las del dominio C-2. La actividad de unión a PS en un MFG-E8 mutante puede reducirse en al menos 10 por ciento, por ejemplo, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o más del 90 por ciento, en comparación con la capacidad de unión a PS en el polipéptido MFG-E8 de tipo silvestre.

Los polipéptidos MFG-E8 mutantes pueden generarse mediante cualquier método estándar de mutagénesis conocido en la técnica o pueden ser variantes de origen natural de polipéptidos MFG-E8 que carezcan de la capacidad de unión a integrina o de la capacidad de unión a PS del MFG-E8 de tipo silvestre. Las mutaciones en la secuencia de aminoácidos de MFG-E8 pueden incluir deleciones, adiciones, sustituciones o cualquier combinación de supresiones, adiciones, sustituciones.

Los métodos estándar de mutagénesis se dirigen típicamente a ácidos nucleicos que codifican la proteína de interés. Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente en la presente descripción, y se refieren tanto al ARN como al ADN, incluyendo ADNc, ADN genómico, ADN sintético y análogos de ácido nucleico que contienen ADN

(o ARN). Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional. Un ácido nucleico puede ser de cadena doble o de cadena sencilla (es decir, una cadena sentido o una cadena antisentido). Ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen genes, fragmentos génicos, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ARNip, micro ARN, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores, así como análogos de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico pueden sintetizarse (por ejemplo, mediante síntesis basada en fosoramidita) u obtenerse a partir de una célula biológica, tal como la célula de un mamífero.

Un ejemplo de una secuencia de ADNc de MFG-E8 de tipo silvestre se muestra en la Figura 12; la secuencia de aminoácidos de ADNc de MFG-E8 de tipo silvestre correspondiente se muestra en la Figura 13. Un ejemplo de una secuencia de ADNc mutante de MFG-E8 se muestra en la Figura 14; la secuencia de aminoácidos de ADNc mutante de MFG-E8 correspondiente se muestra en la Figura 15. Como se usa en la presente descripción, el término "aislado" como se usa en referencia a un ácido nucleico se refiere a un ácido nucleico que está separado de otro ácido nucleico que está presente en un genoma, e incluye los ácidos nucleicos normalmente adyacentes a uno o ambos lados del ácido nucleico en un genoma. El término "aislado" como se usa en la presente descripción con respecto a los ácidos nucleicos, incluye además cualquier secuencia de ácido nucleico que no se produce de forma natural ya que tales secuencias que no se producen de forma natural no se encuentran en la naturaleza y no tienen secuencias inmediatamente contiguas en un genoma producido de forma natural.

Un ácido nucleico aislado puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN, siempre que una de las secuencias de ácido nucleico que se encuentra normalmente inmediatamente adyacente a esa molécula de ADN en un genoma natural esté removida o ausente. De este modo, un ácido nucleico aislado incluye, sin limitación, una molécula de ADN que existe como molécula separada (por ejemplo, un ácido nucleico sintetizado químicamente, ADNc, o fragmento de ADN genómico producido por PCR o tratamiento con endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias así como ADN que se incorpora en un vector, un plásmido de replicación autónoma, un virus (por ejemplo, un retrovirus, lentivirus, adenovirus o virus del herpes), o en el ADN genómico de un procarionte o eucariota. Además, un ácido nucleico aislado puede incluir un ácido nucleico modificado genéticamente tal como una molécula de ADN recombinante que es parte de un ácido nucleico híbrido o de fusión. Un ácido nucleico existente entre cientos de millones de otros ácidos nucleicos dentro de, por ejemplo, bibliotecas de ADNc o bibliotecas genómicas, o porciones de gel que contienen un digesto de restricción de ADN genómico, no debe considerarse un ácido nucleico aislado.

Los ácidos nucleicos proporcionados en la presente descripción pueden tener al menos aproximadamente 8 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, un ácido nucleico puede ser de aproximadamente 8, 9, 10-20 (por ejemplo, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud), 20-50, 50-100 o superior a 100 nucleótidos de longitud (por ejemplo, superior a 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000, 2000, 3000 o 4000 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, un ácido nucleico puede estar en una orientación de sentido o antisentido, puede ser complementario a una secuencia de referencia que codifica un polipéptido MFG-E8 (por ejemplo, Figura 12), y puede ser ADN, ARN o análogos de ácido nucleico. Los análogos de ácido nucleico pueden modificarse en el fragmento base, en el fragmento azúcar o en el esqueleto de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, la hibridación o la solubilidad del ácido nucleico.

Los tipos de mutaciones que un ácido nucleico que codifica un polipéptido MFG-E8 puede portar incluyen, sin limitación, inserciones, deleciones, transiciones, transversiones e inversiones. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido MFG-E8 puede incluir más de una mutación y más de un tipo de mutación. Tales mutaciones, si están presentes dentro de la secuencia codificante, pueden dar lugar a inserciones o deleciones de uno o más aminoácidos de un polipéptido MFG-E8, sustituciones conservativas o no conservativas de aminoácidos dentro de un polipéptido MFG-E8, o la terminación prematura del polipéptido MFG-E8. La inserción o deleción de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la conformación de un dominio funcional. Las sustituciones no conservativas de aminoácidos pueden dar lugar a un cambio sustancial en la mayor parte de la cadena lateral del residuo y, en última instancia, pueden producir un cambio sustancial en la carga, la hidrofobicidad o la estructura de un polipéptido. La terminación prematura puede además causar alteraciones en la estructura secundaria y terciaria del polipéptido. Además, las mutaciones de secuencia no codificantes (por ejemplo, mutaciones en un promotor, elemento regulador o región no traducida) pueden alterar las propiedades del patrón de expresión (por ejemplo, temporal, espacial o de desarrollo) de un polipéptido MFG-E8, por ejemplo, mediante el cambio de las características de unión de un factor de transcripción que actúa en cis.

En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico proporcionada en la presente descripción puede tener al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o 100 %) de identidad de secuencia con una región de una secuencia de referencia (por ejemplo, Figura 12), siempre que la región incluya una o más mutaciones. Tales mutaciones son aquellas, por ejemplo, descritas en la presente descripción. La región es de al menos de diez nucleótidos de longitud (por ejemplo, 10, 15, 20, 50, 60, 70, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o más de 500 nucleótidos de longitud).

Al calcular el porcentaje de identidad de secuencia, se alinean dos secuencias y se determina el número de coincidencias idénticas de nucleótidos o residuos de aminoácidos entre las dos secuencias. El número de coincidencias idénticas se divide por la longitud de la región alineada (es decir, el número de nucleótidos o residuos de aminoácidos

- alineados) y se multiplica por 100 para llegar a un valor de porcentaje de identidad de secuencia. Se apreciará que la longitud de la región alineada puede ser una porción de una o ambas secuencias hasta el tamaño de longitud completa de la secuencia más corta. Se apreciará además que una sola secuencia puede alinearse con más de una otra secuencia y, por lo tanto, puede tener valores de porcentaje de identidad de secuencia diferentes sobre cada región
- 5 alineada. Se observa que el valor de porcentaje de identidad se redondea generalmente al entero más próximo. Por ejemplo, 78,1 %, 78,2 %, 78,3 % y 78,4 % se redondean hacia abajo a 78 %, mientras que 78,5 %, 78,6 %, 78,7 %, 78,8 % y 78,9 % se redondean hacia arriba hasta 79 %. También se observa que la longitud de la región alineada es siempre un número entero.
- 10 Como se usa en la presente descripción, el término "porcentaje de identidad de secuencia" se refiere al grado de identidad entre cualquier secuencia de consulta dada y una secuencia sujeto. Un porcentaje de identidad para cualquier ácido nucleico o secuencia de aminoácidos de consulta, por ejemplo, un factor de transcripción, con relación a otra secuencia de ácido nucleico o aminoácido objeto puede determinarse como sigue.
- 15 Una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de consulta es alineada con una o más secuencias sujeto de ácido nucleico o aminoácidos mediante el uso del programa informático ClustalW (versión 1.82) que permite realizar alineaciones de secuencias de ácido nucleico o de proteína a lo largo de toda su longitud (alineación global).
- 20 ClustalW calcula la mejor coincidencia entre una secuencia consulta y una o más secuencias sujeto, y las alinea para que se puedan determinar identidades, similitudes y diferencias. Pueden insertarse huecos de uno o más residuos en una secuencia de consulta, en una secuencia sujeto, o en ambas, para maximizar alineaciones de secuencia. Para la alineación múltiple de secuencias de ácido nucleico, se pueden usar los siguientes parámetros: penalización de apertura del hueco: 15,0; penalización por extensión del hueco: 6,66; y transiciones de peso: sí. Para la alineación rápida por
- 25 pareja de las secuencias de proteínas, se utilizaron los siguientes parámetros: tamaño de la palabra: 1; tamaño de ventana: 5; método de graduación: porcentaje; número de diagonales superiores: 5; penalización por hueco: 3. El resultado es una alineación de secuencia que refleja la relación entre secuencias. ClustalW puede ejecutarse, por ejemplo, en el sitio searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html de Search Launcher en el Baylor College of Medicine y en el sitio ebi.ac.uk/clustalw del Instituto Europeo de Bioinformática. Para determinar un porcentaje de identidad entre una secuencia de consulta y una secuencia sujeto, el número de bases o aminoácidos coincidentes en la
- 30 alineación se divide por el número total de bases o aminoácidos coincidentes o no coincidentes sin incluir los huecos, seguido por la multiplicación del resultado por 100. El resultado es el porcentaje de identidad de la secuencia sujeto con respecto a la secuencia de consulta.
- 35 Los segmentos de ácido nucleico que codifican el polipéptido MFG-E8 están fácilmente disponibles en el dominio público. Ejemplos de secuencias de MFG-E8 incluyen, sin limitación, el número de Genbank NM_005928, GI: 5174556; BD249734, GI: 33059504; S56151, GI: 235396; y BC003610, GI: 34785035. Alternativamente, los ácidos nucleicos aislados proporcionados en la presente descripción pueden producirse mediante técnicas estándar, incluyendo, sin limitación, técnicas comunes de clonación molecular y síntesis química de ácidos nucleicos. Por ejemplo, se pueden
- 40 usar técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener un ácido nucleico aislado que contiene una mutación. PCR se refiere a un procedimiento o técnica en el cual los ácidos nucleicos diana se amplifican enzimáticamente. La información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá se emplea típicamente para diseñar cebadores de oligonucleótidos que son idénticos en secuencia a cadenas opuestas de la plantilla a
- 45 amplificar. El PCR puede usarse para amplificar secuencias específicas de ADN así como ARN, lo que incluye secuencias de ADN genómico total o ARN celular total. Los cebadores tienen típicamente de 14 a 40 nucleótidos de longitud, pero pueden oscilar entre 10 nucleótidos y cientos de nucleótidos de longitud. Se describen técnicas de PCR generales, por ejemplo en PCR Primer: A Laboratory Manual, ed. Dieffenbach y Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Cuando se usa ARN como fuente de plantilla, puede usarse la transcriptasa inversa para sintetizar cadenas de ADNc. También puede usarse la reacción en cadena de la ligasa, la amplificación del desplazamiento de la cadena, la replicación de secuencia auto-sostenida o la amplificación basada en la secuencia de
- 50 ácido nucleico para obtener ácidos nucleicos aislados. Ver, por ejemplo, Lewis, Genetic Engineering News, 12(9):1 (1992); Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874-1878 (1990); y Weiss, Science, 254:1292 (1991).
- 55 Los ácidos nucleicos aislados proporcionados en la presente descripción pueden además sintetizarse químicamente, ya sea como una molécula de ácido nucleico sencilla (por ejemplo, mediante el uso de síntesis automatizada de ADN en la dirección 3' a 5' mediante el uso de tecnología de fosoramidita) o como una serie de oligonucleótidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse uno o más pares de oligonucleótidos largos (por ejemplo, > 100 nucleótidos) que contienen la secuencia deseada, y cada par contiene un segmento corto de complementariedad (por ejemplo, aproximadamente 15 nucleótidos) de manera que se forma un dúplex cuando el par oligonucleótido es emparejado. Puede usarse una ADN
- 60 polimerasa para extender los oligonucleótidos, dando como resultado una molécula de ácido nucleico de doble cadena única por par de oligonucleótidos, que después puede ligarse a un vector.
- 65 Los métodos de mutagénesis pueden incluir tanto enfoques aleatorios como dirigidos. Los enfoques de mutagénesis aleatoria incluyen, pero no se limitan a, exposición de células a productos químicos o agentes mutagénicos, tales como luz ultravioleta, PCR propensa a error, amplificación de círculos rodantes y el uso de cepas mutadoras bacterianas. El enfoque dirigido que involucra mutagénesis dirigida puede basarse en técnicas basadas en PCR o no basadas en PCR. Se apreciará que un número de ácidos nucleicos puede codificar un polipéptido que tiene una secuencia de

aminoácidos particular. La degeneración del código genético es bien conocida en la técnica; es decir, para muchos aminoácidos, hay más de un triplete de nucleótidos que sirve como codón para el aminoácido.

5 Pueden usarse métodos estándar de biología molecular para confirmar la presencia de una mutación en una secuencia de nucleótidos de MFG-E8. Los ácidos nucleicos que codifican las formas mutantes de MFG-E8 pueden clonarse dentro de una variedad de vectores para un análisis adicional. Un vector es generalmente un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, dentro del cual puede insertarse otro segmento de ADN de modo que se produzca la replicación del segmento insertado. Usualmente, un vector es capaz de replicarse cuando está asociado con los elementos de control apropiados. Los esqueletos de vectores adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos que se usan habitualmente en la técnica tales como plásmidos, virus, cromosomas artificiales, BAC, YAC o PAC. El término "vector" incluye clonación y vectores de expresión, así como vectores virales y vectores de integración. Un "vector de expresión" es un vector que incluye una región reguladora. Los vectores de expresión adecuados incluyen, sin limitación, plásmidos y vectores víricos derivados de, por ejemplo, bacteriófagos, baculovirus y retrovirus. Numerosos vectores y sistemas de expresión están comercialmente disponibles de corporaciones tales como Novagen (Madison, WI), Clontech (Palo Alto, CA), Stratagene (La Jolla, CA) e Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA).

20 Los vectores contienen típicamente una o más regiones reguladoras. El término "región reguladora" se refiere a secuencias de nucleótidos que influyen en la iniciación y velocidad de transcripción o traducción, y en la estabilidad y/o movilidad de un producto de transcripción o traducción. Las regiones reguladoras incluyen, sin limitación, secuencias promotoras, secuencias potenciadoras, elementos de respuesta, sitios de reconocimiento de proteínas, elementos inducibles, secuencias de unión a proteínas, regiones no traducidas 5' y 3' (UTR), sitios de inicio transcripcional, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación e intrones.

25 Como se usa en la presente descripción, el término "operativamente ligada" se refiere a la posición de una región reguladora y una secuencia a transcribir en un ácido nucleico con el fin de influir en la transcripción o traducción de dicha secuencia. Por ejemplo, para llevar una secuencia codificante bajo el control de un promotor, el sitio de iniciación de la traducción del marco de lectura de traducción del polipéptido se coloca típicamente entre uno y aproximadamente cincuenta nucleótidos corriente abajo del promotor. Sin embargo, un promotor puede estar posicionado tanto como aproximadamente 5000 nucleótidos corriente arriba del sitio de iniciación de la traducción, o aproximadamente 2000 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor comprende típicamente al menos un promotor mínimo (basal). Un promotor también puede incluir al menos un elemento de control, tal como una secuencia potenciadora, un elemento corriente arriba o una región de activación corriente arriba (UAR). La elección de los promotores a incluir depende de varios factores, que incluyen, pero no se limitan a, eficiencia, selectividad, inducibilidad, nivel de expresión deseado y expresión preferencial de células o tejidos. Es un asunto de rutina para un experto en la técnica modular la expresión de una secuencia codificante mediante la selección y colocación apropiada de los promotores y otras regiones reguladoras con relación a la secuencia codificante.

40 Los vectores pueden además incluir, por ejemplo, orígenes de replicación, regiones de fijación al andamiaje (SAR), y/o marcadores. Un gen marcador puede conferir un fenotipo seleccionable a una célula, por ejemplo, resistencia a antibióticos. Además, un vector de expresión puede incluir una secuencia etiqueta diseñada para facilitar la manipulación o detección (por ejemplo, purificación o localización) del polipéptido expresado. Las secuencias etiqueta, tales como la proteína verde fluorescente (GFP), glutatión S-transferasa (GST), polihistidina, c-myc, hemaglutinina, o etiqueta Flag™ (Kodak, New Haven, CT) se expresan típicamente como una fusión con el polipéptido codificado. Tales etiquetas pueden insertarse en cualquier lugar dentro del polipéptido, lo que incluye tanto en el carboxilo como en el amino terminal.

50 Los vectores de expresión descritos en la presente descripción que contienen la codificación descrita anteriormente pueden usarse, por ejemplo, para transfectar o transducir tanto células procariotas (por ejemplo, bacterias) como células eucariotas (por ejemplo, levaduras, insectos o mamíferos). Tales células pueden usarse después, por ejemplo, para la producción *in vitro*, a gran o pequeña escala, del polipéptido MFG-E8 mutante mediante métodos conocidos en la técnica. En esencia, tales métodos implican cultivar las células en condiciones que maximicen la producción del polipéptido MFG-E8 mutante y aislar el polipéptido MFG-E8 mutante de las células o del medio de cultivo.

55 Una vez que se han generado los polipéptidos MFG-E8 mutantes, puede confirmarse el efecto de la mutación sobre la actividad biológica de MFG-E8. Por ejemplo, las formas de tipo silvestre y mutantes pueden compararse por su capacidad para unirse a fragmentos RGD aislados, integrinas de longitud completa, o PS *in vitro* e inducir fagocitosis en sistemas de ensayo basados en células.
Anticuerpos

60 Un inhibidor de MFG-E8 puede ser un anticuerpo. En una modalidad, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-MFG-E8. En otra modalidad, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-PS. Los anticuerpos anti-PS y los ligandos para la unión a PS se describen en las patentes de Estados Unidos núms. 6,406,693, 6,818,213, 6,312,694, y 6,783,760 y en Beck et al. 2006 Int J Cancer 118:2639-43. Los anticuerpos anti-PS, por ejemplo, Baviximab (Peregrine Pharmaceuticals), también se describen en la base de datos de ensayos clínicos del Instituto Nacional del Cáncer en http://cancer.gov/clinical_trials. En otra modalidad, el anticuerpo puede ser un anticuerpo que reconozca y bloquee específicamente la actividad de una molécula que funciona en la captación de PS. Ejemplos de dianas de captación de

- PS incluyen Del-1 (ver, por ejemplo, sin limitación, NP_005702, GI: 31317224), Gas6 (ver, por ejemplo, sin limitación, NP_000811, GI: 4557617), Mer (ver, por ejemplo, sin limitación, NP_006334, GI:66932918) y miembros de la familia Tyró (ver, por ejemplo, sin limitación, NP_006284, GI:27597078). Como se usa en la presente descripción, los anticuerpos útiles pueden incluir: anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos, anticuerpos bifuncionales/biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, y anticuerpos trasplantados en la región determinante complementaria (CDR), que son específicos para la proteína diana o fragmentos de la misma, y también incluyen fragmentos de anticuerpo, incluyendo Fab, Fab', F(ab')₂, ScFv, Fv, anticuerpos de camélidos o microanticuerpos.
- Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos homogéneos de especificidad antigénica idéntica producidos por un solo clon de células productoras de anticuerpos. Los anticuerpos policlonales generalmente pueden reconocer epítopos diferentes sobre el mismo antígeno y se producen por más de un clon de células productoras de anticuerpos. Cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminación con otros anticuerpos. El modificador, monoclonal, indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por algún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos núm. 4,816,567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos fágicos mediante el uso de las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).
- Los anticuerpos monoclonales de la presente descripción pueden incluir anticuerpos quiméricos, es decir, anticuerpos que típicamente tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera idéntica o homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos núm. 4,816,567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés incluyen anticuerpos primatizados que comprenden secuencias de unión al antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo simios, monos del Viejo Mundo, monos del Nuevo Mundo, prosimios) y secuencias de la región constante humana.
- Los fragmentos de anticuerpo incluyen generalmente una porción de un anticuerpo intacto. En algunas modalidades, la porción de un anticuerpo intacto puede ser la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto correspondiente. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata et al., *Protein Eng.* 8 (10): 1057-1062); moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpos.
- Un anticuerpo intacto es aquel que comprende una región variable de unión al antígeno así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y dominios constantes de cadena pesada, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. En algunas modalidades el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.
- Puede emplearse una amplia variedad de marcos o andamiajes de anticuerpos/inmunoglobulinas, siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que sea específica para la proteína diana. Dichos marcos o andamiajes incluyen los cinco idiotipos principales de inmunoglobulinas humanas, o fragmentos de los mismos (tales como los descritos en otra parte en la presente descripción), e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, preferentemente con aspectos humanizados. Los anticuerpos de cadena pesada sencilla tales como los identificados en los camélidos son de particular interés a este respecto. Los expertos en la técnica siguen descubriendo y desarrollando nuevos marcos, andamiajes y fragmentos.
- Pueden generarse anticuerpos no basados en inmunoglobulina mediante el uso de andamiajes que no sean de inmunoglobulina sobre los cuales pueda trasplantarse CDR del anticuerpo anti-MFG-E8 o anti-PS. Puede usarse cualquier marco y andamiaje que no sea de inmunoglobulina conocido por los expertos en la técnica, siempre y cuando el marco o andamiaje incluya una región de unión específica para la diana. Ejemplos de marcos o andamiajes que no son de inmunoglobulina incluyen, pero no se limitan a, adnectinas (fibronectina) (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd (Cambridge, MA) y Ablynx nv (Zwijnaarde, Bélgica)), lipocalina (Anticalina) (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), inmunofarmacéuticos modulares pequeños (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc.) (Mountain View, CA)), Proteína A (Affibody AG, Suecia) y afilina (gamma-cristalina o ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).
- El término polipéptido como se usa en la presente descripción se refiere a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos u otros peptidomiméticos, independientemente de la modificación

postraduccional, por ejemplo, fosforilación o glicosilación. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces peptídicos u otros enlaces tales como, por ejemplo, enlaces éster o éter. El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo los isómeros ópticos D/L. Las proteínas de longitud completa, análogos, mutantes y fragmentos de los mismos están abarcados por esta definición.

5 El anticuerpo anti-MICA y/o anti-PS puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla o un fragmento Fab. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una afinidad de unión menor de aproximadamente 1×10^5 Ka para un antígeno distinto de MFG-E8 o PS. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-MFG-E8 es un anticuerpo monoclonal que se une a MFG-E8 con una afinidad de al menos 1×10^8 Ka. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PS es un anticuerpo monoclonal el cual se une a PS con una afinidad de al menos 1×10^8 Ka.

15 Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante el uso del método de Kohler et al. (1975) Nature 256:495-496, o una modificación del mismo. Típicamente, se inmuniza un ratón con una solución que contiene un antígeno. La inmunización puede realizarse mezclando o emulsionando la solución que contiene antígeno en solución salina, en algunas modalidades en un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund, e inyectar la mezcla o emulsión parenteralmente. Puede usarse cualquier método de inmunización conocido en la técnica para obtener los anticuerpos monoclonales. Después de la inmunización del animal, el bazo (y opcionalmente, varios ganglios linfáticos grandes) se elimina y se disocian en células individuales. Las células de bazo pueden tamizarse mediante la aplicación de una suspensión de células a una placa o pozo revestido con el antígeno de interés. Las células B que expresan una inmunoglobulina unida a membrana específica para el antígeno se unen a la placa y no se enjuagan. Las células B resultantes, o todas las células de bazo disociadas, son inducidas después a fusionarse con células de mieloma para formar hibridomas, y se cultivan en un medio selectivo. Las células resultantes se colocan en placas por dilución en serie o limitante y se ensayan para la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de interés (y que no se unen a antígenos no relacionados). Los hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales (AcM) seleccionados se cultivan después ya sea *in vitro* (por ejemplo, en frascos de cultivo de tejidos o reactores de fibra hueca) o *in vivo* (como ascitis en ratones).

30 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-MFG-E8 y/o anti-PS es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Las técnicas de Cole y colaboradores, y Boerner y colaboradores, están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)).

35 Los anticuerpos humanizados pueden modificarse genéticamente por una variedad de métodos que incluyen, por ejemplo: (1) trasplantar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas sobre un marco y una región constantes humanas (un proceso referido en la técnica como humanización), o, alternativamente, (2) trasplantar todos los dominios variables no humanos, pero proporcionándoles una superficie similar a la humana mediante la sustitución de residuos superficiales (un proceso conocido en la técnica como "remodelación de superficie"). Los anticuerpos humanizados pueden incluir tanto anticuerpos humanizados como anticuerpos con superficie remodelada. De manera similar, los anticuerpos humanos pueden hacerse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras el desafío, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluido el reordenamiento de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos núms. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, y en las publicaciones científicas siguientes: Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995); Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169-217 (1994); y Kettleborough, C.A. et al., Protein Eng. 4(7):773-83 (1991).

55 Además de los anticuerpos quiméricos y humanizados, se pueden derivar anticuerpos totalmente humanos a partir de ratones transgénicos que tienen genes de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 6,075,181, 6,091,001, y 6,114,598, o de bibliotecas de presentación de fagos de genes de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991), y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)). En algunas modalidades, los anticuerpos pueden producirse e identificarse mediante bibliotecas de presentación de fagos scFv. La tecnología de presentación de fagos de anticuerpos está disponible a partir de fuentes comerciales tales como Morphosys.

60 Como alternativa al uso de hibridomas para la expresión, los anticuerpos pueden producirse en una línea celular tal como CHO o línea celular mieloma, como se describe en las patentes de Estados Unidos núms. 5,545,403; 5,545,405; y 5,998,144.

Brevemente, la línea celular se transfecta con vectores capaces de expresar una cadena ligera y una cadena pesada, respectivamente. Mediante la transfección de las dos proteínas en vectores separados, puede producirse anticuerpos quiméricos. Immunol. 147:8; Banchereau et al. (1991) Clin. Immunol. Spectrum 3: 8; y Banchereau et al. (1991) Science 251:70.

5 Una región determinante de complementariedad de un anticuerpo incluye típicamente secuencias de aminoácidos que definen conjuntamente la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. Ver, por ejemplo, Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services NIH Publication No. 91-3242 (1991). Una región constante de un anticuerpo incluye típicamente la porción de la molécula de anticuerpo que confiere las funciones efectoras, que incluye, por ejemplo, la porción que se une al receptor Fc en las células dendríticas. En algunas modalidades, las regiones constantes de ratón pueden estar sustituidas por regiones constantes humanas. Por ejemplo, las regiones constantes de anticuerpos humanizados se derivan de inmunoglobulinas humanas. La región constante de la cadena pesada puede seleccionarse de cualquiera de los cinco isotipos: alfa, delta, épsilon, gamma o mu. Un método para humanizar anticuerpos comprende alinear las secuencias no humanas de cadena pesada y ligera a secuencias de cadena pesada y ligera humanas, seleccionar y reemplazar el marco no humano con un marco humano basado en dicha alineación, modelamiento molecular para predecir la conformación de la secuencia humanizada y comparar con la conformación del anticuerpo parental. A este proceso le siguen mutaciones reversas repetidas de los residuos en la región CDR que alteran la estructura de las CDR hasta que la conformación predicha del modelo de la secuencia humanizada se aproxima estrechamente a la conformación de las CDR no humanas del anticuerpo parental no humano. Tales anticuerpos humanizados pueden derivatizarse después para facilitar la captación y eliminación, por ejemplo, a través de receptores de Ashwell. Ver, por ejemplo, patentes de Estados Unidos núms. 5,530,101 y 5,585,089.

25 Los anticuerpos humanos pueden producirse además utilizando animales transgénicos que se modifican genéticamente para contener loci de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, el documento WO 98/24893 describe animales transgénicos que tienen un locus de Ig humana en donde los animales no producen inmunoglobulinas endógenas funcionales debido a la inactivación de loci endógenos de cadena pesada y ligera. El documento WO 91/10741 también describe hospederos mamíferos no-primates transgénicos capaces de montar una respuesta inmunitaria a un inmunógeno, en donde los anticuerpos tienen regiones constantes y/o variables de primate, y en donde los loci endógenos que codifican inmunoglobulinas están sustituidos o inactivado. El documento WO 96/30498 describe el uso del sistema Cre/Lox para modificar el locus de inmunoglobulina en un mamífero, tal como para reemplazar la totalidad o una porción de la región constante o variable para formar una molécula de anticuerpo modificada. El documento WO 94/02602 describe huéspedes mamíferos no humanos que tienen loci de Ig endógena inactivados y loci de Ig humana funcional. La patente de Estados Unidos núm. 5,939,598 describe métodos de fabricación de ratones transgénicos en los que los ratones carecen de cadenas pesadas endógenas, y expresan un locus de inmunoglobulina exógena que comprende una o más regiones constantes xenogénicas. Los anticuerpos también pueden producirse usando técnicas de modificación genética humana como se analiza en la patente de Estados Unidos núm. 5,766,886.

40 Mediante el uso de un animal transgénico descrito anteriormente, puede producirse una respuesta inmunitaria a una molécula antigénica seleccionada, y las células productoras de anticuerpos pueden eliminarse del animal y usarse para producir hibridomas que secreten anticuerpos monoclonales humanos. Los protocolos de inmunización, adyuvantes y similares son conocidos en la técnica y se usan en la inmunización de, por ejemplo, un ratón transgénico como se describe en el documento WO 96/33735. Los anticuerpos monoclonales pueden evaluarse en cuanto a la capacidad para inhibir o neutralizar la actividad biológica o el efecto fisiológico de la proteína correspondiente.

45 Los fragmentos de anticuerpos son adecuados para su uso en los métodos proporcionados siempre que retengan la afinidad y la especificidad deseada del anticuerpo de longitud completa. De este modo, un fragmento de un anticuerpo anti-MFG-E8 y/o anti-PS conservará la capacidad de unirse a MFG-E8 o PS en la porción Fv y la capacidad de unirse al receptor Fc sobre células dendríticas en la porción FC. Tales fragmentos se caracterizan por propiedades similares al anticuerpo de longitud completa correspondiente, es decir, los fragmentos se unirán específicamente a un antígeno humano MFG-E8 o PS expresado en la superficie de una célula humana.

50 También se proporcionan anticuerpos que son SMIP o proteínas de fusión con dominio de unión a inmunoglobulina específicas para la proteína diana. Estos constructos son polipéptidos de cadena sencilla que comprenden dominios de unión a antígenos fusionados a dominios de inmunoglobulina necesarios para llevar a cabo las funciones efectoras del anticuerpo. Ver, por ejemplo, documento WO 03/041600, publicación de patente de Estados Unidos núm. 20030133939 y la publicación de patente de Estados Unidos núm. 20030118592.

60 Puede usarse cualquier forma de MFG-E8 o PS para generar el anticuerpo anti-MFG-E8 y/o anti-PS respectivamente, que incluye, en el caso de MFG-E8, el polipéptido de longitud completa o fragmentos del mismo que portan el epítipo. Los anticuerpos anti-MFG-E8 y anti-PS altamente adecuados son aquellos de afinidad y especificidad suficientes para reconocer y unirse a sus dianas respectivas in vivo. Como se usa en la presente descripción, el término epítipo se refiere a un determinante antigénico de un polipéptido. En algunas modalidades un epítipo puede comprender 3 o más aminoácidos en una conformación espacial que es única para el epítipo. En algunas modalidades, los epítopos son epítopos lineales o conformacionales. Generalmente, un epítipo consta de al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, y al menos 12 tales aminoácidos, y más usualmente, consta de al menos 8-10 de tales aminoácidos. Los

métodos para determinar la conformación espacial de aminoácidos son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones.

5 En algunas modalidades, los anticuerpos se unen específicamente a uno o más epítomos en un dominio extracelular de MFG-E8. Los anticuerpos adecuados pueden reconocer epítomos lineales o conformacionales, o combinaciones de los mismos. Debe entenderse que estos péptidos pueden no necesariamente corresponder exactamente a un epítomo, pero pueden además contener una secuencia de MFG-E8 que no es inmunogénica.

10 Los métodos para predecir otros epítomos potenciales a los que un anticuerpo puede unirse son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen sin limitación, el análisis de Kyte-Doolittle (Kyte, J. y Doolittle, R.F., J. Mol. Biol. (1982) 157:105-132), el análisis de Hopp y Woods (Hopp, T.P. y Woods, K.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78:3824-3828; Hopp, T.J. y Woods, K.R., Mol. Immunol. (1983) 20:483-489; Hopp, T.J., J. Immunol. Methods (1986) 88:1-18.), análisis Jameson-Wolf (Jameson, B.A. y Wolf, H., Comput. Appl. Biosci. (1988) 4:181-186.), y análisis Emini (Emini, E.A., Schlieff, W.A., Colonno, R.J. y Wimmer, E., Virology (1985) 140:13-20). En algunas modalidades, los epítomos potenciales se identifican determinando dominios extracelulares teóricos. Pueden usarse algoritmos de análisis como TMpred (ver K. Hofmann y W. Stoffel (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374,166) o TMHMM (A. Krogh, B. Larsson, G. von Heijne, y E. L. L. Sonnhammer. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. Journal of Molecular Biology, 305(3):567-580, enero de 2001) para hacer tales predicciones. Se pueden usar otros algoritmos, tales como SignalP 3.0 (Bednsten et al. (2004) J Mol Biol. 2004 Jul 16;340(4):783-95) para predecir la presencia de péptidos señal y predecir donde esos péptidos se escindirían de la proteína de longitud completa. Las porciones de las proteínas en el exterior de la célula pueden servir como dianas para la interacción de anticuerpos.

25 Los anticuerpos que se unen específicamente pueden ser anticuerpos que 1) presentan un nivel umbral de actividad de unión; y/o 2) no reaccionan significativamente de forma cruzada con moléculas de polipéptido relacionadas conocidas. La afinidad de unión de un anticuerpo puede determinarse fácilmente por un experto ordinario en la técnica, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949. En algunas modalidades los anticuerpos pueden unirse a sus epítomos diana o señuelos miméticos al menos 1,5 veces, 2 veces, 5 veces 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, 10^6 veces o mayor para el polipéptido diana asociado al cáncer que a otras proteínas que se predice tienen alguna homología con MFG-E8.

35 En algunas modalidades los anticuerpos se unen con alta afinidad de 10^{-4} M o menos, 10^{-7} M o menos, 10^{-9} M o menos o con afinidad subnanomolar (0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 nM o incluso menos). En algunas modalidades la afinidad de unión de los anticuerpos para MICA es de al menos 1×10^6 Ka. En algunas modalidades la afinidad de unión de los anticuerpos para MICA es al menos 5×10^6 Ka, al menos 10^7 Ka, al menos 2×10^7 Ka, al menos 1×10^8 Ka, o mayor. Los anticuerpos pueden además describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un polipéptido MFG-E8 o PS. En algunas modalidades, las afinidades de unión incluyen aquellas con una K_d menor que 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M, o menos.

45 En algunas modalidades, los anticuerpos no se unen a moléculas de polipéptido relacionadas conocidas; por ejemplo, se unen al polipéptido MFG-E8 pero no a polipéptidos relacionados conocidos mediante el uso de un análisis de inmunotransferencia estándar (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, 1994).

50 En algunas modalidades, los anticuerpos pueden tamizarse contra polipéptidos relacionados conocidos para aislar una población de anticuerpos que se una específicamente a polipéptidos MFG-E8 o a PS. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para los polipéptidos MFG-E8 humanos fluirán a través de una columna que comprende proteínas relacionadas con MFG-E8 (con la excepción de MFG-E8) adheridas a la matriz insoluble bajo condiciones de tampón adecuadas. Este tamizaje permite el aislamiento de anticuerpos policlonales y monoclonales que no tengan reacción cruzada hacia polipéptidos estrechamente relacionados (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan et al. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995). El tamizaje y aislamiento de anticuerpos específicos son bien conocidos en la técnica (ver Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff et al., Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J. W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin et al., Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984). Ejemplos representativos de tales ensayos incluyen: inmunoelectroforesis concurrente, radioinmunoensayo (RIA), radioinmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), ensayos dot blot o Western blot, ensayo de inhibición o competición, y ensayo sandwich.

60 Los anticuerpos pueden purificarse por métodos cromatográficos conocidos por los expertos en la técnica, que incluye intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel (por ejemplo, Caine et al., Protein Expr. Purif. (1996) 8(2):159-166). Alternativamente o adicionalmente, los anticuerpos pueden adquirirse de fuentes comerciales, por ejemplo, Invitrogen (Carlsbad, CA); MP Biomedicals (Solon, OH); Nventa Biopharmaceuticals (San Diego, CA) (antes Stressgen); Serologicals Corp. (Norcross, GA).

65

El inhibidor de MFG-E8 puede incluir un anticuerpo monoclonal que reconozca un solo epítipo MFG-E8 o puede ser cualquier combinación de anticuerpos monoclonales o policlonales que reconozcan uno o más epítipos de MFG-E8 diferentes. Por lo tanto, el inhibidor de MFG-E8 puede incluir anticuerpos que reconozcan 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 20 o más epítipos de MFG-E8 diferentes.

5 En algunas modalidades, los anticuerpos pueden actuar como antagonistas de MFG-E8. Por ejemplo, en algunas modalidades los anticuerpos pueden alterar parcial o totalmente las interacciones entre MFG-E8 y las integrinas $\alpha\beta3$ y/o $\alpha\beta5$. En algunas modalidades, los anticuerpos pueden alterar parcial o totalmente las interacciones entre MFG-E8 y P/S. En algunas modalidades, se proporcionan anticuerpos que modulan la actividad del ligando o la actividad del receptor en al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 60 % o al menos el 50 % en comparación con la actividad en ausencia del anticuerpo.

15 En algunas modalidades se proporcionan anticuerpos neutralizantes. En algunas modalidades, los anticuerpos neutralizantes actúan como antagonistas del receptor, es decir, que inhiben todas o un subconjunto de las actividades biológicas de la activación del receptor mediada por el ligando. En algunas modalidades los anticuerpos pueden especificarse como agonistas, antagonistas o agonistas inversos para las actividades biológicas que comprenden las actividades biológicas específicas de los péptidos descritos en la presente descripción.

20 En algunas modalidades, la composición inhibidora de MFG-E8 puede incluir una combinación de anticuerpos anti-MFG-E8 y anticuerpos contra el antígeno-4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4). CTLA-4 es una serina proteasa de gránulos asociados a linfocitos T citotóxicos que parece estar implicada en la activación de células T. Las secuencias de aminoácidos de polipéptidos CTLA-4 humanos representativos incluyen, por ejemplo, sin limitación, los números de GenBank NM_005214 y NM_001037631. La unión de CTLA-4 a los ligandos B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) induce la detención del ciclo celular y la disminución de la producción de citocinas. La actividad de bloqueo transitorio de CTLA-4 con anticuerpos anti-CTLA-4 ("bloqueo de CTLA-4") potencia las respuestas de células T específicas de antígenos con toxicidad limitada.

30 El anticuerpo anti-CTLA-4 puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla o un fragmento Fab. Los anticuerpos anti-CLTA-4 pueden prepararse como se ha descrito anteriormente. Puede usarse cualquier epítipo CTLA-4 para generar los anticuerpos, siempre y cuando el anticuerpo resultante se una a CTLA-4 in vivo de tal manera que bloquee la unión de los ligandos CTLA-4, B7-1 y B7-2. Los anticuerpos de bloqueo pueden identificarse en base a su capacidad para competir con los ligandos marcados B7-1 y B7-2 para la unión a CTLA-4 mediante el uso de métodos de tamizaje estándar.

35 Antígenos tumorales

En la presente descripción se proporcionan, además, composiciones que incluyen uno o más antígenos tumorales que provocan una respuesta inmunitaria contra un tumor. Típicamente, tales antígenos tumorales se usan para tratar el cáncer mediante la estimulación del sistema inmunitaria para reconocer y atacar células cancerosas humanas sin dañar las células normales. Un antígeno tumoral es una molécula (por ejemplo, un polipéptido, carbohidrato o lípido) que se expresa por una célula tumoral y o bien (a) difiere cualitativamente de su contraparte expresada en células normales, o (b) se expresa a un nivel más alto en el tumor que en las células normales. Por lo tanto, un antígeno tumoral puede diferir (por ejemplo, por uno o más residuos de aminoácidos donde la molécula es una proteína) de, o puede ser idéntica, a su contraparte expresada en células normales. Preferentemente no se expresa por células normales. Alternativamente, se expresa a un nivel al menos dos veces mayor (por ejemplo, dos veces, tres veces, cinco veces, diez veces, 20 veces, 40 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces, 5000 veces o 15 000 veces más) en una célula tumoral que en la contraparte normal de la célula tumoral.

50 Los antígenos tumorales también pueden incluir proteínas purificadas o parcialmente purificadas. Ejemplos de antígenos tumorales incluyen, sin limitación, antígeno carcinoembrionario (CEA), RAGE, MART (antígeno de melanoma), MAGE (antígeno de melanoma) 1-4, 6 y 12, MUC (mucina) (por ejemplo, MUC-1, MUC-2, etcétera), tirosinasa, Pmel 17 (gp100), secuencia V intrónica de GnT-V (secuencia V intrónica de N-acetilglucosaminiltransferasa V), psm del cáncer de próstata, PRAME (antígeno de melanoma), β -catenina, MUM-1-B (producto génico mutante ubicuo de melanoma), GAGE (Antígeno del melanoma) 1, BAGE (antígeno del melanoma) 2-10, c-ERB2 (Her2/neu), EBNA (antígeno nuclear del virus Epstein-Barr) 1-6, gp75, virus del papiloma humano (HPV) E6 y E7, p53, proteína de resistencia pulmonar (LRP) Bc1-2, antígeno prostático específico (PSA) y Ki-67.

60 Los antígenos tumorales pueden ser células tumorales intactas. Las células tumorales se vuelven típicamente incapaces de proliferar por irradiación antes de administrarse al paciente. Los métodos de irradiación son conocidos por los expertos en la técnica y pueden incluir exposición a radiaciones γ , x, de haz de electrones y/o ultravioleta (longitud de onda de 10 nm a 320 nm, por ejemplo, 50 nm a 320 nm, 100 nm a 320 nm, 150 nm a 320 nm, 180 nm a 320 nm, o 200 nm a 300 nm). Los expertos en la técnica serán capaces de identificar una dosis de radiación suficiente para hacer que las células se vuelvan incapaces de replicarse, conservando al mismo tiempo la estructura de la célula tumoral.

65 Las células tumorales pueden ser las células del propio paciente (autólogas) o líneas celulares cancerosas alogénicas. Un método útil para provocar una respuesta inmunitaria contra un tumor en un paciente puede incluir la inmunización

con células tumorales autólogas irradiadas secretoras de GM-CSF. En este método, se usa una muestra muerta de las propias células tumorales del paciente que ha sido genéticamente modificada para expresar la citocina inmunoestimulante, GM-CSF, para estimular una respuesta inmunitaria contra el tumor del paciente. El ADN recombinante que codifica GM-CSF puede introducirse en las células tumorales por métodos estándar, por ejemplo, transferencia de genes mediada por retrovirus o adenovirus. Se han descrito métodos para la producción de células tumorales autólogas irradiadas secretoras de GM-CSF y el uso de células tumorales autólogas irradiadas secretoras de GM-CSF para estimular una respuesta inmunitaria contra el cáncer en Soiffer R, Lynch T, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schmollinger JC, Hodi FS, Liebster L, Lam P, Mentzer S, Singer S, Tanabe KK, Cosimi AB, Duda R, Sober A, Bhan A, Daley J, Neuberger D, Parry G, Rokovich J, Richards L, Drayer J, Berns A, Clift S, Cohen LK, Mulligan RC, Dranoff G. "Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony stimulating factor generates potent anti-tumor immunity in patients with metastatic melanoma". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998; 95: 13141-13146 y en Soiffer RJ, Hodi FS, Haluska F, Jung K, Gillessen S, Singer S, Tanabe K, Duda R, Mentzer S, Jaklitsch M, Bueno R, Clift S, Hardy S, Neuberger D, Mulligan RC, Webb I, Mihm M, Dranoff G. "Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony stimulating factor by adenoviral mediated gene transfer augments anti-tumor immunity in patients with metastatic melanoma". J. Clin. Oncol. 2003;21:3343-3350.

Alternativa o adicionalmente, puede proporcionarse GM-CSF mediante el uso de otra célula que exprese GM-CSF. La célula que expresa GM-CSF puede ser otro tipo o línea de células humanas que se ha transfectado establemente con un ácido nucleico que codifica para GM-CSF. Una línea celular útil es K562, una línea celular de CML que tiene bajo nivel de expresión de clase I y clase II que no es inducible con IFN γ y por lo tanto está asociada con una baja probabilidad de respuesta alógena. Las células K562 pueden transfectarse establemente con un plásmido que codifica para GM-CSF y un gen de resistencia a puomicina. La línea celular puede cultivarse en cultivo en suspensión, y por lo tanto es manejable para su fabricación a gran escala. Las células GM-K562 pueden secretar niveles relativamente altos de GM-CSF in vitro (9-13 μ g de GM-CSF por 10⁶ células durante 24 horas, durante las primeras 24 horas después de la descongelación). Típicamente, se produce el 100 % de detención del crecimiento a dosis de radiación de 10 000 cGy, pero la secreción de GM-CSF persiste durante al menos 7 días.

En algunas modalidades, el GM-GSF puede administrarse como un polipéptido purificado o parcialmente purificado. El GM-CSF puede purificarse a partir de fuentes naturales o producido como una proteína recombinante. El GM-CSF también está disponible a partir de fuentes comerciales, que incluye, por ejemplo, OnbraVEX GM-CSF (Biovex, Oxford, U.K.) Molgramostim (Leucomax, Schering & Plough, Madison, NJ, EE.UU.) y Sagramostim (Leukine®, Berlex Oncology).

Métodos de Tratamiento/Prevención del Cáncer

En la presente descripción se proporcionan métodos para tratar y/o prevenir el cáncer o síntomas de cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más antígenos de células tumorales y un inhibidor de MFG-E8. Los métodos descritos en la presente descripción son generalmente útiles para generar respuestas inmunitarias y como vacunas profilácticas o agentes terapéuticos estimuladores de la respuesta inmunitaria. Como se usa en la presente descripción, "profilaxis" puede significar la prevención completa de los síntomas de una enfermedad, un retraso en el inicio de los síntomas de una enfermedad, o una disminución en la severidad de los síntomas de la enfermedad que se desarrollan posteriormente. Como se usa en la presente descripción, "terapia" puede significar una abolición completa de los síntomas de una enfermedad o una disminución en la severidad de los síntomas de la enfermedad. Los tipos de cáncer son bien conocidos para aquellos en la técnica y puede incluir, sin limitación, cánceres de la piel, por ejemplo, melanoma y carcinoma de célula basal, pulmón, mama, riñón, ovario, endometrio, próstata, gástrico, colon, colorrectal, vesícula, pancreático, testicular, estómago, esofágico, tiroides, huesos, cerebro, neurológico, cabeza y cuello, cáncer de células germinales o hematológicas, por ejemplo, leucemia y linfoma, rhabdomyosarcoma (que surge del músculo), retinoblastoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, y. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer asociado con la sobreexpresión de MFG-E8. En algunas modalidades, el cáncer es melanoma, pulmón, mama, riñón, ovario y carcinoma de colon, así como ciertas leucemias. En algunas modalidades, el sujeto ha sido diagnosticado con cáncer o como predispuesto al cáncer.

Los síntomas del cáncer son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, sin limitación, lunares con características inusuales, un cambio en la apariencia de un lunar, incluyendo asimetría, borde, color y/o diámetro, un área de piel nuevamente pigmentada, un lunar anormal, área oscurecida bajo las uñas, bultos en la mama, cambios en los pezones, quistes en las mamas, dolor en las mamas, muerte, pérdida de peso, debilidad, fatiga excesiva, dificultad para comer, pérdida del apetito, tos crónica, empeoramiento de la falta de aliento, tos con sangre, sangre en la orina, sangre en las heces, náuseas, vómitos, metástasis hepáticas, metástasis pulmonares, metástasis óseas, plenitud abdominal, hinchazón, líquido en la cavidad peritoneal, sangrado vaginal, estreñimiento, distensión abdominal, perforación del colon, peritonitis aguda (infección, fiebre, dolor), dolor, vómito de sangre, sudoración intensa, fiebre, presión arterial alta, anemia, diarrea, ictericia, mareos, escalofríos, espasmos musculares, metástasis de colon, metástasis pulmonares, metástasis de vejiga, metástasis hepáticas, metástasis óseas, metástasis renal y metástasis pancreáticas, dificultad para tragar, y similares.

Las composiciones pueden administrarse directamente a un sujeto. Generalmente, uno o más antígenos de células tumorales y un inhibidor de MFG-E8 pueden suspenderse en un portador farmacéuticamente aceptable (por ejemplo,

solución salina fisiológica). Puede prepararse una composición combinando cualquiera de las composiciones moduladoras de MFG-E8 proporcionadas en la presente descripción con un portador farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos pueden incluir, sin limitación, soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos incluyen aceite mineral, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables, por ejemplo. Los portadores acuosos incluyen, sin limitación, agua, alcohol, solución salina y soluciones tamponadas. Además pueden estar presentes conservantes, saborizantes, y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares. Se apreciará que cualquier material descrito en la presente descripción que va a administrarse a un mamífero puede contener uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

Cualquier composición descrita en la presente descripción puede administrarse a cualquier parte del cuerpo del hospedero. Una composición puede suministrarse a, sin limitación, las articulaciones, la mucosa nasal, la sangre, los pulmones, los intestinos, los tejidos musculares, la piel o la cavidad peritoneal de un mamífero. Además, una composición puede administrarse mediante inyección intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intramuscular, intrarrectal, intravaginal, intratecal, intratraqueal, intradérmica o transdérmica, mediante administración oral o nasal, mediante inhalación o mediante perfusión gradual en el tiempo. En un ejemplo adicional, una preparación de aerosol de una composición puede administrarse a un hospedero mediante inhalación.

La dosis requerida depende de la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza de la enfermedad del paciente, el tamaño, el peso, el área superficial, la edad y el sexo del sujeto, otros fármacos administrados y el juicio del médico a cargo. Las dosis adecuadas están en el intervalo de 0,01-1000 µg/kg. Se espera amplias variaciones en la dosificación necesaria en vista de la variedad de antígenos de células tumorales y de las composiciones moduladoras de MFG-E8 disponibles y de las diferentes eficiencias de diversas vías de administración. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse mediante el uso de rutinas empíricas estándar para la optimización como se entiende bien en la técnica. Las administraciones pueden ser simples o múltiples (por ejemplo, 2 o 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150 o más veces). La encapsulación de la composición en un vehículo de suministro adecuado (por ejemplo, micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficiencia del suministro.

La duración del tratamiento con cualquier composición proporcionada en la presente descripción puede ser cualquier lapso de tiempo desde tan corto como un día hasta tan largo como el tiempo de vida del hospedero (por ejemplo, muchos años). Por ejemplo, los antígenos de células tumorales y las composiciones moduladoras de MFG-E8 pueden administrarse una vez al mes durante tres meses o una vez al año durante un período de diez años. También se observa que la frecuencia del tratamiento puede ser variable. Por ejemplo, los antígenos de células tumorales y las composiciones moduladoras de MFG-E8 pueden administrarse una vez (o dos, tres veces, etcétera) diaria, semanal, mensual o anual. Los antígenos de células tumorales y las composiciones moduladoras de MFG-E8 pueden administrarse conjuntamente, es decir, en el mismo punto en el tiempo o secuencialmente. Por ejemplo, un paciente puede recibir una célula tumoral autóloga irradiada, seguida por una célula que expresa GM-CSF, seguida por una composición moduladora de MFG-E8, separadas por intervalos de horas, días, meses o años.

Alternativamente o además, las composiciones pueden administrarse junto con un adyuvante. Un "adyuvante" es un compuesto inmunológico que puede potenciar una respuesta inmunitaria contra un antígeno particular tal como un polipéptido. Ejemplos de adyuvantes incluyen alumbre y otros compuestos basados en aluminio (por ejemplo, Al₂O₃). Los compuestos basados en aluminio se pueden obtener de varios proveedores comerciales. Otros adyuvantes incluyen complejos inmunoestimulantes (ISCOM) que pueden contener componentes tales como colesterol y saponinas; uno o más componentes inmunoestimulantes adicionales, que incluyen, sin limitación, muramildipéptido (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP), monofosforil lípido A (MPL) y tripéptidos que contienen formilmetionina tales como N-formil-Met-Leu-Phe. Tales compuestos están comercialmente disponibles por ejemplo en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) y RIBI ImmunoChem Research, Inc. (Hamilton, MT). Otros adyuvantes pueden incluir oligodesoxinucleótidos CpG (Coley Pharmaceuticals), QS21 (Cambridge Biotech) y MF59 (Chiron). Además pueden usarse adyuvantes que potencian la función de las células dendríticas; los ejemplos incluyen GM-CSF, ligando de Flt3, e interferones.

Las composiciones proporcionadas en la presente descripción pueden contener cualquier relación del adyuvante con respecto al anticuerpo. La relación adyuvante:anticuerpo puede ser por ejemplo 50:50 (vol:vol). Alternativamente, la relación adyuvante:anticuerpo puede ser, sin limitación, 90:10, 80:20, 70:30, 64:36, 60:40, 55:45, 40:60, 30:70, 20:80, o 90:10.

Una cantidad eficaz de cualquier composición proporcionada en la presente descripción puede administrarse a un hospedero. El término "eficaz" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier cantidad que induzca una respuesta inmunitaria deseada mientras no induzca una toxicidad significativa en el hospedero. Tal cantidad se puede determinar evaluando la respuesta inmunitaria del hospedero después de la administración de una cantidad conocida de una composición particular. Además, el nivel de toxicidad, si lo hay, puede determinarse mediante la evaluación de los síntomas clínicos de un hospedero antes y después de administrar una cantidad conocida de una composición particular. Se observa que la cantidad eficaz de una composición particular administrada a un hospedero puede ajustarse de acuerdo con el resultado deseado, así como la respuesta del hospedero y el nivel de toxicidad. La toxicidad

significativa puede variar para cada hospedero en particular y depende de múltiples factores que incluyen, sin limitación, el estado de la enfermedad del hospedero, la edad y la tolerancia al dolor.

5 Los anticuerpos también pueden administrarse a un sujeto a través de la transferencia de genes de anticuerpos terapéuticos in vivo, como se analiza en Fang et al. (2005), Nat. Biotechnol. 23, 584-590. Por ejemplo, pueden generarse vectores recombinantes para suministrar un casete de expresión multicistrónico que comprende un péptido que media la autoescisión cotraduccional independiente de enzimas de polipéptidos colocados entre las secuencias codificadoras de cadena pesada y ligera de AcM. La expresión conduce a cantidades estequiométricas de ambas cadenas de AcM. En algunas modalidades, el péptido que media la autoescisión cotraduccional independiente de 10 enzimas es el péptido 2A derivado de la fiebre aftosa.

Cualquier método conocido en la técnica puede usarse para determinar si se induce una respuesta inmunitaria particular. Las mediciones útiles incluyen la infiltración tumoral por linfocitos T CD4 y CD8⁺, la presencia de altos títulos de anticuerpos contra antígenos tumorales en el suero post-inmunización y la destrucción dirigida de la vasculatura tumoral. Además, pueden usarse métodos clínicos que puedan evaluar el grado del estado de una enfermedad 15 particular para determinar si se induce la respuesta inmunitaria deseada. Por ejemplo, en un paciente de cáncer, una reducción en la carga tumoral o un retraso en la recurrencia o metástasis puede indicar una respuesta inmunitaria deseada en un paciente tratado con antígenos de células tumorales y composiciones moduladoras de MFG-E8.

20 Se describen métodos para tratar profilácticamente a un paciente que está predispuesto a desarrollar cáncer, una metástasis de cáncer, o que ha tenido una metástasis y es por lo tanto susceptible a una recaída o recidiva. Los métodos son particularmente útiles en individuos de alto riesgo que, por ejemplo, tienen antecedentes familiares de cáncer o de tumores metastásicos, o muestran una predisposición genética para una metástasis de cáncer. En algunas modalidades, los tumores son tumores relacionados con MFG-E8. Además, los métodos son útiles para prevenir que los 25 pacientes tengan recidivas de tumores relacionados con MFG-E8, que hayan tenido tumores relacionados con MFG-E8 eliminados por resección quirúrgica o tratados con un tratamiento convencional de cáncer. Además se proporcionan métodos para inhibir la progresión del cáncer y/o para provocar la regresión del cáncer, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de antígenos de células tumorales y composiciones moduladoras de MFG-E8.

30 En algunas modalidades, el paciente que necesita tratamiento anticancerígeno puede tratarse con los antígenos de células tumorales y las composiciones moduladoras de MFG-E8 descritas en la presente descripción conjuntamente con uno o más anticuerpos dirigidos a dianas distintas de MFG-E8. Las dianas adecuadas pueden incluir moléculas de superficie de células cancerosas, por ejemplo, el receptor de EGF, VEGF, HER-2, CD20, c-Met, ErbB3, angiopoyetinas 35 y gangliósidos tales como GM2.

En algunas modalidades, el paciente que necesita un tratamiento anticancerígeno se trata con los antígenos de células tumorales y las composiciones moduladoras de MFG-E8 descritas en la presente descripción conjuntamente con quimioterapia y/o radioterapia. Por ejemplo, después de la administración de los antígenos de células tumorales y de las 40 composiciones moduladoras de MFG-E8, el paciente puede tratarse además con una cantidad terapéuticamente eficaz de radiación anticancerígena. En algunas modalidades, el tratamiento quimioterapéutico se proporciona en combinación con antígenos de células tumorales y composiciones moduladoras de MFG-E8. En algunas modalidades, los antígenos de células tumorales y las composiciones moduladoras de MFG-E8 se administran en combinación con quimioterapia y radioterapia.

45 Los métodos de tratamiento comprenden administrar al paciente dosis únicas o múltiples de uno o más antígenos de células tumorales y composiciones moduladoras de MFG-E8. En algunas modalidades, los antígenos de células tumorales y las composiciones moduladoras de MFG-E8 se administran como composiciones farmacéuticas inyectables que son estériles, libres de pirógeno y que comprenden los antígenos de células tumorales y las composiciones 50 moduladoras de MFG-E8 en combinación con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, los regímenes terapéuticos descritos en la presente descripción se usan con regímenes de tratamiento convencionales para cáncer que incluyen, sin limitación, cirugía, radioterapia, ablación de hormonas y/o quimioterapia. La administración de los antígenos de células tumorales y las composiciones moduladoras de MFG-E8 55 descritas en la presente descripción pueden tener lugar antes de, simultáneamente con, o después del tratamiento convencional contra el cáncer. En algunas modalidades, se administran al paciente dos o más antígenos de células tumorales y composiciones moduladoras de MFG-E8 diferentes.

60 Terapia de combinación

En algunas modalidades se proporcionan composiciones que comprenden dos o más antígenos de células tumorales y composiciones moduladoras de MFG-E8. En algunas modalidades, los antígenos de células tumorales son células tumorales autólogas que expresan GM-CSF. Las composiciones moduladoras de MFG-E8 pueden ser formas mutantes de MFG-E8 que carecen o carecen sustancialmente de la capacidad de unirse a las integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$. Las 65 composiciones moduladoras de MFG-E8 también pueden ser anticuerpos anti-MFG-E8 y/o anticuerpos anti-PS. Las composiciones pueden incluir además una célula o línea celular que expresa GM-CSF. Las composiciones que

comprenden dos o más composiciones moduladoras de MFG-E8 pueden administrarse a personas o mamíferos que padecen de, o están predispuestas a padecer, cáncer. Uno o más anticuerpos pueden además administrarse con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o un quimioterapéutico para el cáncer. La administración simultánea de dos o más agentes terapéuticos no requiere que los agentes se administren al mismo tiempo o por la misma ruta, siempre que exista una superposición en el periodo de tiempo durante el cual los agentes ejercen su efecto terapéutico. Se contempla la administración simultánea o secuencial, así como la administración en diferentes días o semanas.

En algunas modalidades los métodos proporcionados contemplan la administración de combinaciones, o "cocteles", de diferentes anticuerpos. Tales cocteles de anticuerpos pueden tener ciertas ventajas en la medida en que contienen anticuerpos que explotan diferentes mecanismos efectores o combinan anticuerpos directamente citotóxicos con anticuerpos que dependen de la funcionalidad del efector inmunitario. Tales anticuerpos combinados pueden presentar efectos terapéuticos sinérgicos. Los anticuerpos útiles pueden incluir anticuerpos dirigidos al receptor de EGF, por ejemplo, Cetuximab (Erbix™), anticuerpos que se dirigen al VEGF, por ejemplo, Bevacizumab (Avastin™) y anticuerpos que se dirigen a Her-2, por ejemplo, trastuzumab (Herceptin™)

Un agente citotóxico se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o toxinas sintéticas, o fragmentos de las mismas. Un agente no citotóxico se refiere a una sustancia que no inhibe o previene la función de la célula y/o no causa la destrucción de células. Un agente no citotóxico puede incluir un agente que puede activarse para ser citotóxico. Un agente no citotóxico puede incluir una microesfera, liposoma, matriz o partícula (ver, por ejemplo, publicaciones de patente de Estados Unidos núm. 2003/0028071 y 2003/0032995. Tales agentes pueden estar conjugados, acoplados, unidos o asociados con un anticuerpo descrito en la presente descripción.

En algunas modalidades, se administran medicamentos de cáncer convencionales con las composiciones descritas en la presente descripción. Agentes altamente adecuados incluyen los agentes antiangiogénicos. Los agentes antiangiogénicos bloquean la capacidad de los tumores para estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos necesarios para su supervivencia. Puede usarse cualquier agente antiangiogénico conocido por los expertos en la técnica, que incluye agentes tales como Bevacizumab (Avastin®, Genentech, Inc.) que bloquean la función del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Otros ejemplos incluyen, sin limitación, Dalteparina (Fragmin®), Suramin ABT-510, Fosfato de Combretastatina A4, Lenalidomida, LY317615 (Enzastaurina), Isoflavona de Soya (Genisteína, Proteína de Soya Aislada) AMG-706, anticuerpo anti-VEGF, AZD2171, Bay 43-9006 (tosilato de Sorafenib), PI-88, PTK787/ZK 222584 (Vatalanib), SU11248 (malato de sunitinib), VEGF-Trap, XL184, ZD6474, Talidomida, ATN-161, EMD 121974 (Cilenigrida) y Celecoxib (Celebrex®).

Otros agentes útiles incluyen aquellos agentes que promueven daños en el ADN en células cancerosas, por ejemplo, roturas de doble cadena en el ADN celular. Puede usarse cualquier forma de agente perjudicial para el ADN conocida por los expertos en la técnica. El daño del ADN puede producirse típicamente mediante radioterapia y/o quimioterapia. Ejemplos de radioterapia incluyen, sin limitación, radioterapia externa y radioterapia interna (también llamada braquiterapia). Las fuentes de energía para la radioterapia externa incluyen rayos X, rayos gamma y haces de partículas; las fuentes de energía usadas en la radiación interna incluyen yodo radiactivo (yodo¹²⁵ o yodo¹³¹), y estroncio⁹⁰, o radioisótopos de fósforo, paladio, cesio, iridio, fosfato o cobalto. Los métodos de administración de radioterapia son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplos de agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN incluyen, sin limitación, Busulfán (Myleran), Carboplatino (Paraplatin), Carmustina (BCNU), Clorambucil (Leukeran), Cisplatino (Platinol), Ciclofosfamida (Cytoxan, Neosar), Dacarbazina (DTIC-Dome), Ifosfamida (Ifex), Lomustina (CCNU), Mecloretamina (mostaza nitrogenada, Mustargen), Melfalan (Alkeran) y Procarbrazina (Matulane)

Otros agentes quimioterapéuticos para el cáncer incluyen, sin limitación, agentes alquilantes, tales como carboplatino y cisplatino; agentes alquilantes de mostaza nitrogenada; agentes alquilantes de nitrosourea, tales como carmustina (BCNU); antimetabolitos, tales como metotrexato; ácido folínico; antimetabolitos análogos de purina, mercaptopurina; antimetabolitos análogos de pirimidina, tales como fluorouracilo (5-FU) y gemcitabina (Gemzar®); antineoplásicos hormonales, tales como goserelina, leuprolida y tamoxifeno; antineoplásicos naturales, tales como aldesleucina, interleucina-2, docetaxel, etopósido (VP-16), interferón alfa, paclitaxel (Taxol®) y tretinoína (ATRA); antibióticos antineoplásicos naturales, tales como bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, daunomicina y mitomicinas incluyendo mitomicina C; y los antineoplásicos naturales de alcaloide vinca, tales como vinblastina, vincristina, vindesina; hidroxiurea; aceglatona, adriamicina, ifosfamida, encitabina, epitiostanol, aclarubicina, ancitabina, nimustina, clorhidrato de procarbrazina, carboquona, carboplatino, carmofur, cromomicina A3, polisacáridos antitumorales, factores plaquetarios antitumorales, ciclofosfamida (Cytoxin®), Schizophyllan, citarabina (citosina arabinósido), dacarbazina, tiosina, tiotepa, tegafur, dolastatinas, análogos de dolastatina tales como auristatina, CPT-11 (irinotecan), mitozantrona, vinorelbina, tenipósido, aminopterina, carminomicina, esperamicinas (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos núm. 4,675,187), neocarzinostatina, OK-432, bleomicina, furtulón, broxuridina, busulfán, honvan, peplomicina, bestatina (Ubenimex®), interferón-β, mepitiostano, mitobronitol, melfalán, péptidos de laminina, lentinan, extracto de Coriolus versicolor, tegafur/uracilo, estramustina estrógeno/mecloretamina).

Agentes adicionales que pueden usarse como terapia para pacientes de cáncer incluyen EPO, G-CSF, ganciclovir; antibióticos, leuprolide; meperidina; zidovudina (AZT); interleucinas 1 a la 18, que incluye mutantes y análogos; interferones o citocinas, tales como interferones, hormonas α , β y γ ; hormonas, tales como hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) y análogos y, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH); factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de nervios (NGF), factor de liberación de hormona de crecimiento (GHRF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor homólogo del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFHF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), y factor de crecimiento de insulina (IGF); factor de necrosis tumoral α y β (TNF- α y β); factor-2 inhibidor de la invasión (IIF-2); proteínas morfogenéticas óseas 1-7 (BMP 1-7); somatostatina; timosina- α -1; gamma-globulina; superóxido dismutasa (SOD); factores del complemento; y factores antiangiogénesis.

Profármaco se refiere a un precursor o una forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica o no citotóxica a células tumorales en comparación al fármaco parental y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en una forma activa o la forma parental más activa. Ver, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615^a Reunión de Belfast (1986) y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al., (Ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos incluyen, pero no están limitados a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados de aminoácido D, profármacos glicosilados, profármacos que contienen betalactama, profármacos opcionalmente sustituidos que contienen fenoxiacetamida o profármacos opcionalmente sustituidos que contienen fenilacetamida, 5-fluocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma profármaco para usar en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

25 Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales y Métodos

30 Ratonés. Ratonés deficientes en GM-CSF, GM-CSF/IL-3, IFN- γ (Dalton et al., 1993) y GM-CSF/IL-3/IFN- γ se retrocruzaron al menos nueve generaciones con la cepa C57Bl/6 y alojados en condiciones libres de patógenos específicos. Los genotipos fueron confirmados por PCR (Enzler et al., 2003), y los experimentos se llevaron a cabo bajo un protocolo aprobado por el IACUC del Dana-Farber Cancer Institute acreditado por la AAALAC.

35 Ensayos de fagocitosis. Se generaron células apoptóticas al exponer timocitos a 10 μ M de dexametasona a 37 °C durante 6 horas, esplenocitos a irradiación gamma de 40 Gy y células T Jurkat a 5 mg/ml de etopósido (Sigma-Aldrich) a 37 °C durante 16 horas. Las células necróticas se indujeron mediante cinco ciclos de congelación-descongelación o cultivo en etanol al 20 % durante 60 minutos. El porcentaje de células apoptóticas y necróticas se cuantificó con tinción de anexina V y yoduro de propidio, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich). Las células apoptóticas o necróticas se marcaron con 5- (y 6-) carboxitetrametilrodamina, éster succinimidílico [5(6)-TAMRA, SE, Molecular Probes] o éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE, Molecular Probes) a 37 °C durante 40 15 minutos.

45 Los macrófagos se recuperaron por lavado de la cavidad peritoneal 48 horas después de la instilación de tioglicolato (2 mg/ml: Sigma-Aldrich) o con microesferas CD1 1b (Miltenyi Biotech) del bazo, hígado y lavado broncoalveolar, y se cultivaron con RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor, L-glutamina y penicilina/estreptomocina. Las células dendríticas se aislaron a partir de bazo mediante el uso de microesferas de CD11c (Miltenyi Biotech) o se generaron a partir de células de médula ósea (2×10^6 /pozo) mediante cultivo durante siete días mediante el uso de medios condicionados (días 0, 2, 4) de células B16 secretoras de GM-CSF o Flt3-L (Mach et al., 2000). Los macrófagos o células dendríticas (1×10^5) se expusieron durante dos horas a células apoptóticas o necróticas marcadas (1×10^6), se lavaron, se tiñeron con AcM a CD11b o CD11c (BD Pharmingen) y se evaluó la eficiencia de la fagocitosis mediante citometría de flujo.

55 Ensayos de citocinas. Se midieron TGF- β , IL-6, IL-1, IL-12p70, IL-23p19, IL-10 y TNF- α en sobrenadantes de cultivo con un ELISA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce-Endogen, R&D Systems, eBioscience). Para la tinción de citocinas intracelulares, las células T se estimularon con 1 mg/ml de PMA y 50 ng/ml de ionomicina durante cuatro horas y se añadió GolgiPlug (BD-Pharmingen) durante 2 horas a 37 °C. Las células se tiñeron con AcM anti-CD3, CD4 o CD8, se fijaron y permeabilizaron con Cytotfix/Cytoperm (BD-Pharmingen), se tiñeron de nuevo con anti-IFN- γ , anti-IL-17 y AcM de control de isotipo (BD Pharmingen), y se analizaron por citometría de flujo.

60 Ensayos de proliferación celular. Los macrófagos peritoneales se expusieron a células apoptóticas o necróticas durante 2 horas, se lavaron, se co-cultivaron en placas de fondo plano de 96 pozos con esplenocitos Balb/c durante 72 horas y se determinó la captación de 3 H-timidina. Para los ensayos de supresión, las células T CD4⁺CD25⁺ se obtuvieron mediante el uso de un kit de aislamiento de células T reguladoras (Miltenyi Biotech), de acuerdo con el protocolo del fabricante. La capacidad de Tregs para inhibir la proliferación de células T efectoras CD4⁺CD25⁻ y la producción de IL-2 se evaluó mediante el uso de procedimientos estándar.

5 Ensayos de quimiotaxis. Los sobrenadantes de macrófagos expuestos a células apoptóticas se diluyeron 1:10 en medio de cultivo y se añadieron a los pozos inferiores de una microcámara que contenía un filtro de policarbonato con poros de 8 μ m (Coster-Corning). Se aplicaron células T CD4⁺CD25⁺ o CD4⁺CD25⁻ (1x10⁴células/pozo) a la parte superior de la cámara en presencia o ausencia de anticuerpo neutralizante anti-humano CCL22/MDC o control de isotipo (R&D systems). Después de la incubación a 37 °C durante dos horas, las células que migraron a la parte inferior de la cámara se colectaron y se contaron.

10 Citometría de flujo. Los macrófagos se pretrataron con GolgiPlug (BD-Pharmingen) 1 ml/ml durante 4 horas a 37 °C, se tiñeron con AcM anti-CD11b (BD-Pharmingen), se fijaron y permeabilizaron con tampón Cytotfix/Cytoperm (BD-Pharmingen) y se tiñeron de nuevo con AcM MFG-E8 no conjugado (Alexia) o AcM Gas6 (R&D Systems) seguido de Ac anti-IgG2 de cabra (BD-Pharmingen) marcado con PE. Para la tinción con FoxP3, se marcaron las células linfoides con AcM anti-CD3 y CD4 (BD Pharmingen), se lavaron y después se tiñeron con anticuerpo anti-FoxP3 marcado con PE mediante el uso del sistema de tinción de FoxP3 de acuerdo con el protocolo del fabricante (eBioscience). La adquisición celular se realizó con un citómetro de flujo FW501 (Beckman-Coulter) y se analizó mediante el software FlowJo (Tree Star).

20 Transferencia de genes mediada por retrovirus. Las secuencias de longitud completa que codifican los marcos abiertos de lectura de MFG-E8 o el mutante RGE (MFG-E8 mutante en el cual la secuencia RGD en el segundo dominio EGF se reemplaza con RGE) se introdujeron en el vector retroviral pMFG, y se prepararon con células 293-GPG altos títulos de stocks virales de replicación defectuosa pseudotipados con VSV-G, como se ha descrito anteriormente (Mach et al., 2000). Los macrófagos peritoneales replicantes se transdujeron en presencia de 10 ng/ml de M-CSF (R&D Systems).

25 Después de 48 horas de preacondicionamiento con 5-FU (150 mg/kg), se aislaron células de médula ósea de ratones de 8-10 semanas de edad de tipo silvestre y deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ y se cultivaron durante la noche con X-VIVO (Cambrex) suplementado con factor de células madre (100 ng/ml) y trombopoyetina (50 ng/ml). Las células se transdujeron con sobrenadantes retrovirales durante 48 horas y después se inyectaron 1 x 10⁶ células en receptores irradiados letalmente (dos dosis de 560 rads, separadas 6 horas entre sí, mediante el uso de una fuente de ¹³⁷Cs). Ocho semanas después del trasplante, los ratones se sacrificaron y se analizaron para la expresión de MFG-E8, capacidad fagocítica y subconjuntos de células T CD4⁺ como anteriormente.

35 Experimentos con melanoma B16. Para los estudios de prevención de tumores, se inyectaron subcutáneamente ratones C57Bl/6 hembras de 8-12 semanas de edad en el flanco con 1 x 10⁶ células B16 irradiadas (150 Gy) de tipo silvestre o transducidas retroviralmente (GM-CSF, MFG-E8 y/o RGE) y siete días después se desafiaron por vía subcutánea en la espalda con 1x10⁶ células B16 vivas. Para el modelo de terapia, los ratones se inyectaron el día 0 o 3 con 5 x 10⁵ células B16 vivas y se trataron los días 0, 7 y 14 con 1 x 10⁶ células B16 modificadas genéticamente irradiadas. Se monitoreó el crecimiento del tumor y se registró el producto de los diámetros del tumor.

40 Los linfocitos infiltrantes de tumores se obtuvieron a partir de los sitios de desafío con B16 mediante el uso de separación celular por gradiente Nocoprep (Axis-Shield) seguida de purificación de células T CD3⁺ con esferas magnéticas (Miltenyi) marcadas con anti-CD3. Las células se analizaron por citometría de flujo mediante el uso de AcM contra CD4, CD8, CD69 y FoxP3. Se determinaron las respuestas CD8⁺ específicas del antígeno frente a los péptidos con restricción H-2^b (DFCI Molecular Biology Core) derivados de TRP-2 (180-188: SVYDFVWL) o E1A (234-243: SGPSNTPPEI) mediante la incubación de linfocitos durante 72 horas con 1x10⁵ células B16 y 25 U/ml de IL-2 y midiendo la producción de IFN- γ mediante ELISPOT mediante el uso de esplenocitos pulsados con péptido como dianas.

Ejemplo 2: El GM-CSF regula la fagocitosis de las células apoptóticas

50 Las células marcadas entradas en apoptosis por dexametasona o etopósido o necróticas por congelación-descongelación se añadieron a macrófagos peritoneales CD11b⁺ de tipo silvestre o deficientes en GM-CSF y la eficiencia de la ingestión se midió por citometría de flujo. Se observó afectación en la captación por macrófagos peritoneales deficientes en GM-CSF en el caso de células T Jurkat tratadas con etopósido y esplenocitos irradiados con gamma, mientras que la captación de células entradas en necrosis por ciclos de congelación-descongelación repetidos o tratamiento con etanol al 20 % estaba intacta (Figura 1A y no mostrado). Los macrófagos deficientes en GM-CSF/IL-3 y GM-CSF/IL-3/IFN- γ mostraron perfiles de fagocitosis comparables, revelando un requerimiento selectivo de GM-CSF en la captación de células apoptóticas (no mostrado). Las células dendríticas que expresan CD11c purificadas de los bazos de ratones deficientes en GM-CSF manifestaron una afectación similar, aunque las células dendríticas generadas por el cultivo de precursores de médula ósea con el ligando Flt3 (Flt3-L) mostraron una ingestión eficiente del material apoptótico (Figura 1B). Estos últimos resultados concuerdan con un reciente informe que indica que las células dendríticas estimuladas con Flt3-L emplean un proceso llamado "proceso de digestión fragmentada" ("nibbling") para ingerir células moribundas, en contraste con el englobamiento desencadenado con GM-CSF (Janssen et al., 2006). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que, bajo condiciones de estado estacionario, el GM-CSF puede ser una señal más importante que Flt3-L para regular la fagocitosis por células dendríticas de las células apoptóticas.

65

De acuerdo con estudios previos, los macrófagos de tipo silvestre indujeron cantidades sustanciales de TGF- β pero mínimas de IL-1, IL-6, IL-12p70 e IL-23p19 en respuesta a células apoptóticas (Fadok et al., 1998; Huynh Et al., 2002, Kim et al., 2004, Stark et al., 2005), mientras que las células necróticas indujeron el perfil opuesto (Figura 1C). Por el contrario, los macrófagos deficientes en GM-CSF (no mostrado), GM-CSF/IL-3, GM-CSF e IL-3/IFN- γ produjeron significativamente menos TGF- β , pero más IL-1, IL-6, IL-12p70 e IL-23p19 después de la exposición tanto a células apoptóticas como necróticas. Los macrófagos deficientes en GM-CSF/IL-3 generaron los niveles más altos de IL-12p70, mientras que los macrófagos deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ generaron los niveles más altos de IL-23p19, lo que sugiere que el IFN- γ también contribuye a la regulación de citocinas. Se observaron pocas diferencias en la producción de IL-10 o TNF- α a través del conjunto de ratones (no mostrado).

Para examinar la relevancia funcional de la afectación de la fagocitosis de las células apoptóticas, realizamos reacciones leucocitarias mixtas con macrófagos peritoneales de ratones deficientes en citocinas y esplenocitos de ratones Balb/c alogénicos de tipo silvestre (Figura 1D). Mientras que los fagocitos de tipo silvestre y los deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ cargados con células necróticas estimularon respuestas robustas de células T alogénicas, la ingestión de células apoptóticas por macrófagos de tipo silvestre suprimió las respuestas proliferativas más eficientemente que los macrófagos deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ .

Ejemplo 3: El GM-CSF regula la expresión de MFG-E8

El análisis de PCR en tiempo real de los macrófagos peritoneales deficientes en GM-CSF reveló cambios mínimos o nulos en los niveles de MARCO, CD36, receptor depurador clase A, y el receptor putativo de fosfatidilserina, los transcritos de MFG-E8 se redujeron significativamente en comparación con las células de tipo silvestre (no mostrado). La citometría de flujo confirmó la marcada disminución en la expresión de MFG-E8 en macrófagos aislados de la cavidad peritoneal, el bazo, el hígado y el pulmón de ratones deficientes en GM-CSF (Figura 2A). Las células dendríticas esplénicas y las células dendríticas derivadas de médula ósea generadas por Flt3-L mostraron reducciones similares en MFG-E8, subrayando la importancia del GM-CSF endógeno para la expresión de esta osonina (Figura 2B). Además, la ingestión eficiente de células apoptóticas por las células dendríticas inducidas por el ligando Flt3 (Figura 1B) en ausencia de MFG-E8 sugiere que estas células pueden usar múltiples receptores para la eliminación del cadáver. Se observaron disminuciones comparables en la expresión de MFG-E8 con células presentadoras de antígeno de ratones deficientes en GM-CSF/IL-3 y GM-CSF/IL-3/IFN- γ (no mostrado). Dado que la captación mediada por MFG-E8 de células moribundas implica integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ e intersecta con la vía Gas-6/Mer (Hanayama et al., 2002, Wu et al., 2005), también ensayamos la expresión de estas moléculas en macrófagos deficientes en GM-CSF. Se observaron reducciones modestas mediante citometría de flujo (Figura 8), lo que sugiere que el GM-CSF regula ampliamente la captación basada en fosfatidilserina de células apoptóticas.

Para delinear la contribución de la deficiencia de MFG-E8 a la afectación de la fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos deficientes en GM-CSF, reconstituimos la expresión de MFG-E8 in vitro mediante la transducción retroviral de macrófagos peritoneales replicantes, mediante el uso de M-CSF como mitógeno. Para estos experimentos, también generamos un alto título de virus que codifica un mutante MFG-E8 previamente descrito, en el cual la secuencia RGD implicada en la unión a integrina se modificó a RGE (Asano et al., 2004). Dado que esta proteína conserva la capacidad de unirse a la fosfatidilserina en células apoptóticas, pero no puede internalizarse en fagocitos, este constructo funciona como un inhibidor negativo dominante. La citometría de flujo documentó que los macrófagos deficientes en GM-CSF, GM-CSF/IL-3 y GM-CSF/IL-3/IFN- γ transducidos alcanzaron niveles de MFG-E8 comparables a los macrófagos de tipo silvestre (no mostrado). La restauración de MFG-E8 aumentó la fagocitosis de células apoptóticas en células deficientes en GM-CSF a los niveles de tipo silvestre, mientras que la sobreexpresión de MFG-E8 en células de tipo silvestre aumentó aún más la ingestión de cadáveres (Figura 2C). Los niveles de MFG-E8 no afectaron la captación de células necróticas (no mostrado). Por el contrario, el mutante RGE disminuyó la ingestión de células apoptóticas en macrófagos de tipo silvestre y en deficientes en citocinas.

La modulación de la vía MFG-E8 dio lugar a cambios significativos en la producción de citocinas y la inmunogenicidad. La expresión forzada de MFG-E8 en macrófagos deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ restableció la secreción de TGF- β y redujo la producción de IL-1, IL-6, IL-12p70 e IL-23p19 a niveles comparables a los controles de tipo silvestre (Figura 2D). En cambio, el mutante RGE disminuyó la secreción de TGF- β y aumentó la producción de IL-1, IL-6, IL-12p70 e IL-23p19 en macrófagos de tipo silvestre. Además, el mutante RGE anuló los efectos inhibitorios de las células apoptóticas sobre la actividad aloestimuladora de macrófagos peritoneales de tipo silvestre (Figura 2E). En cambio, la transducción de MFG-E8 normalizó la actividad aloestimuladora aberrante de macrófagos deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ expuestos a células apoptóticas. Esta supresión requirió TGF- β , ya que la adición de anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β antagonizó los efectos de la transducción de MFG-E8, pero no los del mutante RGE.

Ejemplo 4: El GM-CSF es necesario para la homeostasis de Treg a través de la captación de células apoptóticas mediada por MFG-E8

Para explorar si la captación mediada por MFG-E8 de células moribundas podría contribuir a la homeostasis de Treg bajo condiciones fisiológicas, primero co-cultivamos células T CD4⁺ singénicas de tipo silvestre con macrófagos peritoneales cargados de células apoptóticas y después analizamos la expresión de FoxP3 (Figura 3A). Mientras que las células de tipo silvestre estimularon eficientemente los Tregs, los macrófagos GM-CSF/IL-3/IFN- γ se vieron

afectados. La transducción de MFG-E8 tanto de macrófagos tipo silvestre como deficientes en citocina dio como resultado un aumento de células FoxP3⁺, mientras que el mutante RGE disminuyó la inducción de Treg. Los experimentos de bloqueo de anticuerpos establecieron que la expansión mediada por MFG-E8 de Treg requirió TGF- β y MHC clase II (Figura 3B). Las células FoxP3⁺ proliferaron durante el co-cultivo y manifestaron actividad supresora típica en reacciones leucocitarias mixtas alogénicas (no mostrado). Además, el sobrenadante de macrófagos de tipo silvestre cargados de células apoptóticas, pero no el de los deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ , provocó la migración selectiva de células T CD4⁺CD25⁺ de una forma dependiente de CCL22 (Figura 3C). La reconstitución de la expresión de MFG-E8 en macrófagos deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ restauró la quimiotaxis de células T CD4⁺CD25⁺ dependientes de CCL22 (Curiel et al., 2004)

Para determinar si la afectación de la inducción de Tregs *in vitro* era indicativa de alteración de la homeostasis Treg *in vivo*, cuantificamos las células FoxP3⁺ en los ratones mutantes. Aunque no se observaron diferencias en el número de células T CD4⁺CD25⁺ esplénicas, la frecuencia de células T CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺ en ratones deficientes en GM-CSF (no mostrado), GM-CSF/IL-3 y GM-CSF/IL-3/IFN- γ disminuyó significativamente en comparación con los controles de tipo silvestre (Figura 3D). Los números absolutos de células FoxP3⁺ fueron $3,5 \pm 1,8 \times 10^5$ células/bazo para 5 ratones de tipo silvestre, $0,7 \pm 0,1 \times 10^5$ células/bazo para 5 ratones deficientes en GM-CSF/IL-3 y $0,7 \pm 0,4 \times 10^5$ células/bazo para 5 ratones deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ (cualquiera de las cepas knockout frente a la tipo silvestre, $p=0,007$). Se observaron reducciones similares en los Treg en los ganglios linfáticos, pero no en el timo de los ratones mutantes (Figura 9), lo que sugiere que el mantenimiento periférico, más que la producción, podría ser el defecto primario. Las células T CD4⁺CD25⁺ de ratones deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ mostraron una actividad supresora más débil comparada con células CD4⁺CD25⁺ de ratones de tipo silvestre en ensayos estándar *in vitro* (Figura 10), aunque se requieren estudios adicionales mediante el uso de células FoxP3⁺ purificadas para evaluar la función reguladora sobre la base de una célula individual.

Ejemplo 5: El GM-CSF regula los subconjuntos de células T efectoras CD4⁺ a través de MFG-E8

El aumento de la producción de citocinas inflamatorias por células presentadoras de antígeno deficientes en GM-CSF cargadas de células apoptóticas planteó la posibilidad de que los subconjuntos de células T efectoras CD4⁺ podrían estar alterados. Para investigar este tema, co-cultivamos células T vírgenes singénicas de tipo silvestre CD3⁺CD45RA⁺CD62^{hi} con macrófagos peritoneales cargados de células apoptóticas y después analizamos la expresión de IL-17 e IFN- γ mediante citometría de flujo (Figura 4A). En consonancia con la secreción aumentada de p70 de IL-12, los macrófagos deficientes en GM-CSF/IL-3 estimulados aumentaron las células Th1. La combinación de niveles aumentados de IL-23, IL-1 e IL-6 en macrófagos deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ produjo el aumento de células Th17. La transducción de MFG-E8 de macrófagos deficientes en citocinas suprimió el desarrollo de células efectoras CD4⁺. Se obtuvieron hallazgos comparables mediante el uso de células dendríticas derivadas de médula ósea generadas en presencia de Flt3-L (Figura 4B). De acuerdo con estos resultados, la expresión del mutante RGE en macrófagos de tipo silvestre promovió células Th1, mientras que la transducción de macrófagos deficientes en IFN- γ con el mutante RGE desencadenó células Th17 (Figura 4C). Para determinar si se generaron subconjuntos de células T CD4⁺ similares *in vivo*, se estimularon esplenocitos recién aislados con PMA e ionomicina (Figura 4D). El sesgo a Th1 fue evidente en ratones deficientes en GM-CSF, mientras que las células Th17 fueron predominantes en ratones deficientes en GM-CSF/IFN- γ .

Ejemplo 6: La reconstitución de MFG-E8 normaliza los subconjuntos CD4⁺ en ratones deficientes en GM-CSF

Para probar además el papel de MFG-E8 en la regulación del subconjunto de células T CD4⁺ dependiente de GM-CSF, realizamos experimentos de trasplante de médula ósea. Los progenitores hematopoyéticos de ratones de tipo silvestre y deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ se transdujeron con vectores retrovirales y se infundieron en receptores letalmente irradiados de 2-4 meses de edad. Los ratones se sacrificaron dos meses después del trasplante, y la expresión de GFP/MFG-E8 se documentó en macrófagos (no mostrado). La transducción de MFG-E8 dio como resultado el aumento de la fagocitosis de células apoptóticas tanto en macrófagos de tipo silvestre como en deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ , mientras que el mutante RGE redujo la eliminación de cadáveres en ambas cepas (Figura 5A). La expresión forzada de MFG-E8 dio como resultado niveles aumentados de TGF- β y niveles reducidos de IL-6, IL-23p19 e IL-17 en el suero de ratones tipo silvestre y deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ (Figura 5B). No se observaron cambios en las concentraciones de IL-12p70. Por el contrario, el mutante RGE indujo una disminución de los niveles de TGF- β , pero aumentó los niveles de IL-6, IL-12p19, IL-17 e IL-12p70 en el suero de animales trasplantados. El mutante RGE disparó además los niveles circulantes de IFN- γ en ratones de tipo silvestre. Este aumento de la producción de citocinas proinflamatorias podría explicar la baja incidencia de mortalidad tras el trasplante observada sólo en animales que recibieron médula ósea que expresa RGE (no mostrado). La citometría de flujo reveló que la transducción de MFG-E8 incrementó los Treg FoxP3⁺ en esplenocitos de tipo silvestre y en esplenocitos deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ , mientras que el mutante RGE disminuyó los Treg en ratones de tipo silvestre (Figura 5C). El MFG-E8 suprimió, pero el mutante RGE aumentó las células Th17 en ratones deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ , mientras que el mutante RGE aumentó las células Th1 en receptores de tipo silvestre (Figura 5D). La transducción de MFG-E8 restableció además los efectos inmunosupresores de las células apoptóticas en ratones deficientes en GM-CSF/IL-3/IFN- γ , como se documentó por la reducción de la actividad aloestimuladora (Figura 5E). En conjunto, estos hallazgos establecen un requerimiento de MFG-E8 en las actividades inmunorreguladoras del GM-CSF.

Ejemplo 7: La maduración de células presentadoras de antígenos implica la regulación negativa de MFG-E8

5 Dado que MFG-E8 juega un papel crítico en la tolerancia desencadenada por GM-CSF, la inmunidad protectora
 inducida por GM-CSF puede implicar la regulación negativa de la función MFG-E8. En concordancia con esta idea,
 trabajos previos mostraron que las células dendríticas derivadas de médula ósea inmaduras generadas con GM-CSF
 manifiestan altos de expresión de MFG-E8, mientras que la maduración inducida por LPS dio como resultado una
 disminución de MFG-E8 (Miyasaka et al., 2004). Aquí ampliamos estos hallazgos al mostrar que el tratamiento de
 10 macrófagos peritoneales de tipo silvestre con múltiples agonistas de TLR incluyendo péptidoglicano (TLR2), poli-I-C
 (TLP3), LPS (TLP4) u oligonucleótidos CpG (TLR9) suprimió la inducción de MFG-E8 ante la exposición a células
 apoptóticas (Figura 6A). Esta inhibición demostró ser funcionalmente importante, ya que la expresión forzada de MFG-
 E8 (a través de la transducción retroviral) antagonizó la reducción de TGF- β y el aumento de IL-6 estimulado por LPS
 (Figura 6B). El MFG-E8 suprimió además la actividad aloestimuladora potenciada de macrófagos cargados de células
 15 apoptóticas tratados con LPS (Figura 6C).

Trabajos recientes establecieron que las células dendríticas B220⁻ derivadas de la médula ósea generadas en presencia
 de Flt3-L, pero no las B220⁺, presentaron eficientemente de forma cruzada antígenos de células apoptóticas para
 estimular respuestas de células T citotóxicas CD8⁺ (Janssen et al., 2006). Se encontró que la expresión de MFG-E8 se
 restringió a células dendríticas B220⁺, mientras que la maduración con LPS o células necróticas resultó en la regulación
 20 negativa de MFG-E8 en estas y en células dendríticas derivadas de GM-CSF (Figura 6D). Las células dendríticas
 generadas en presencia de Flt3-L clasificadas como B220⁺, pero no B220⁻, secretaron TGF- β ante la exposición a
 células apoptóticas, aunque no ante células necróticas. En contraste, las células dendríticas B220⁻ pero no las B220⁺,
 produjeron IFN- α en respuesta a células apoptóticas, y esto se incrementó con LPS, de acuerdo con el reporte anterior
 (Janssen et al., 2006). Las células dendríticas B220⁻, pero no las B220⁺, también produjeron IFN- α en respuesta a
 25 células necróticas. En conjunto, estos hallazgos apoyan la idea de que MFG-E8 contribuye al potencial tolerogénico de
 los subconjuntos de células dendríticas específicas.

Ejemplo 8: El MFG-E8 regula los efectos antitumorales de las vacunas secretoras de GM-CSF

30 Para examinar directamente el impacto de MFG-E8 sobre las respuestas protectoras estimuladas por GM-CSF,
 utilizamos el modelo de melanoma B16 (Dranoff et al., 1993). En este sistema, la vacunación con células tumorales
 irradiadas secretoras de GM-CSF protege eficientemente a los ratones C57Bl/6 singénicos de tipo silvestre del desafío
 posterior con células B16 vivas de tipo silvestre, mientras que la vacunación con células B16 parentales irradiadas es
 ineficaz (Figura 7A). La inmunización con células B16 que expresan el mutante RGE no pudo proteger contra la
 35 estimulación tumoral, lo que indica que el bloqueo de la fosfatidilserina no fue suficiente para la inmunidad protectora en
 este sistema. Las vacunas compuestas de células B16 secretoras de MFG-E8 fueron similarmente inactivas. Sin
 embargo, la co-expresión de MFG-E8 anuló la inmunidad protectora provocada con células tumorales secretoras de
 GM-CSF, mientras que el mutante RGE no lo hizo.

40 Para determinar si el mutante RGE podría aumentar los efectos antitumorales de GM-CSF, utilizamos un modelo de
 terapia en el cual se inició la vacunación el mismo día que el desafío tumoral (Figura 7B). Bajo estas condiciones, las
 células B16 irradiadas secretoras de GM-CSF suscitan un ligero retardo en el crecimiento del tumor, pero todos los
 animales eventualmente sucumben a la progresión del tumor. La co-expresión de MFG-E8 también inhibió el impacto de
 45 las células tumorales secretoras de GM-CSF en este sistema. Sin embargo, el mutante RGE potenció la destrucción del
 tumor inducida por GM-CSF, ya que casi todos los ratones sobrevivieron al desafío con B16 de tipo silvestre (7 de 8).
 Cuando se inició la terapia tres días después de la inyección de B16, los tumores crecieron inicialmente, pero la
 combinación GM-CSF/RGE detuvo la progresión de la enfermedad e indujo regresión en algunos animales (no
 mostrado). No se observaron toxicidades del tratamiento.

50 Para analizar los mecanismos subyacentes a estos efectos, aislamos los linfocitos infiltrantes del tumor de los sitios de
 desafío de B16 de tipo silvestre. La co-expresión de MFG-E8 dio lugar a un aumento de Treg intratumorales (Figura 7C),
 mientras que la co-expresión del mutante RGE inhibió el reclutamiento de Treg en comparación con B16 células que
 secretan sólo GM-CSF (Figura 7D). Además, el mutante RGE potenció la activación de los linfocitos infiltrantes de
 tumores CD8⁺ y aumentó el número de células efectoras CD8⁺ secretoras de IFN- γ específicas de proteína 2
 55 relacionada con la tirosinasa (TRP-2), restringidas por MHC clase I, mientras que estas se redujeron con MFG-E8
 (Figura 7E).

Los tumores cosechados de ratones tratados mostraron diferencias sorprendentes en el aspecto macroscópico. Los
 60 melanomas que surgieron en ratones vírgenes (no mostrado) o en animales que recibieron la vacuna GM-CSF/MFG-E8
 estaban fuertemente pigmentados, mientras que los que se desarrollaron después de la vacuna GM-CSF o la
 combinación GM-CSF/RGE no lo estaban (Figura 7F). El examen histopatológico confirmó las diferencias en la
 producción de melanina (no mostrado). Estos hallazgos sugieren que la modulación mediada por MFG-E8 de la
 inmunidad frente a los antígenos de diferenciación de melanocitos, tales como TRP-2, esculpe el fenotipo de tumores
 65 progresivos, en concordancia con el concepto de edición inmunológica (Dunn et al., 2004).

Estudios adicionales mostraron que los macrófagos asociados a tumores en diversas malignidades humanas muestran altos niveles de MFG-E8 mediante inmunohistoquímica (Figura 16 y los datos no mostrados).

Ejemplo 9

Mientras el MFG-E8 se detectó por inmunohistoquímica en macrófagos del centro germinal y en macrófagos alveolares de ratones de tipo silvestre, en concordancia con reportes anteriores, no se observó tinción en los bazo o pulmones de animales deficientes en GM-CSF (Figura 13) o en macrófagos tímicos de cualquiera de ambas cepas. Las células dendríticas esplénicas y las células dendríticas derivadas de médula ósea en presencia de Flt3-L, de ratones deficientes en GM-CSF mostraron además reducciones en MFG-E8 en comparación con los niveles de tipo silvestre (descritos anteriormente), mientras que se observaron disminuciones similares con células presentadoras de antígenos deficientes en GM-CSF/IL-3 y GM-CSF/IL-3/IFN- γ . También se detectaron reducciones modestas en $\alpha\beta_5$, Gas-6 y Mer (ver anteriormente), lo que sugiere que el GM-CSF regula ampliamente la captación basada en fosfatidilserina de células apoptóticas.

Para aclarar la contribución de la deficiencia de MFG-E8, utilizamos transducción retroviral para reconstituir la expresión de MFG-E8 en macrófagos peritoneales in vitro. También se generó un alto título de virus que codifica para un mutante de MFG-E8 previamente descrito, en el cual la secuencia RGD implicada en la unión a integrina se modificó a RGE. Esta proteína conserva la capacidad de unirse a la fosfatidilserina en las células apoptóticas, pero no puede internalizarse y por lo tanto funciona como un inhibidor negativo dominante. La citometría de flujo documentó que los macrófagos deficientes en citocinas transducidos alcanzaron niveles de MFG-E8 comparables a las células de tipo silvestre (no mostrado). La restauración de MFG-E8 aumentó la fagocitosis de células apoptóticas en células deficientes en GM-CSF a los niveles de tipo silvestre, mientras que la sobreexpresión de MFG-E8 en células de tipo silvestre aumentó además la ingestión de cadáveres (anterior). La microscopía confocal demostró que el MFG-E8 medió el englobamiento de células apoptóticas, en lugar de simplemente la unión a la superficie de los fagocitos (Figura 15). Los niveles de MFG-E8 no alteraron la captación de células necróticas (no mostrado). Por el contrario, el mutante RGE disminuyó la ingestión de células apoptóticas en macrófagos de tipo silvestre y en deficientes en citocinas.

Ejemplo 10: un modelo de las funciones duales para el GM-CSF en la tolerancia e inmunidad protectora

Como se muestra en los ejemplos anteriores, identificamos la proteína de unión a fosfatidilserina MFG-E8 como un determinante principal de la función del GM-CSF. Bajo condiciones de estado estacionario, el GM-CSF induce la expresión de MFG-E8 en las células presentadoras de antígeno, lo que resulta en la fagocitosis eficiente de células apoptóticas, el mantenimiento de Tregs en la periferia, y la supresión de células Th1 y Th17 autorreactivas. Sin embargo, bajo condiciones de estrés, los agonistas de TLR o células necróticas regulan negativamente la expresión de MFG-E8, por lo que el GM-CSF estimula respuestas protectoras a través de un mecanismo independiente de MFG-E8. En conjunto, estos hallazgos delimitan un circuito homeostático GM-CSF/MFG-E8 que regula el equilibrio de subconjuntos de células T CD4⁺ (Figura 11).

A la luz de las actividades inmunorreguladoras de MFG-E8, ¿por qué el suministro de GM-CSF como terapia contra el cáncer aumenta las respuestas antitumorales? Nuestros resultados indican que diversos agonistas TLR y células necróticas regulan negativamente la expresión de MFG-E8 en las células presentadoras de antígeno, y esta supresión puede requerirse para la inmunidad protectora. De hecho, la producción forzada de MFG-E8 antagonizó el impacto inmunoestimulador de los agonistas de TLR y las vacunas de células tumorales irradiadas secretoras de GM-CSF, mientras que altos niveles de MFG-E8 endógenos fueron asociados con subconjuntos de células dendríticas tolerogénicas. Mientras el bloqueo de la función MFG-E8 con el mutante RGE fue insuficiente para suscitar protección en el modelo de melanoma B16, junto con GM-CSF la estrategia mostró efecto terapéutico contra las lesiones preexistentes. Esta actividad intensificada sugiere que las vacunas tumorales irradiadas secretoras de GM-CSF, a solas desencadenan sólo una regulación negativa parcial de MFG-E8 in vivo. La inmunidad potenciada provocada por la combinación de tratamientos implicó la inhibición de Tregs y la amplificación de células T citotóxicas CD8⁺, lo que da como resultado una respuesta diversificada del hospedero capaz de mediar la regresión de tumores establecidos en la ausencia de toxicidad. Este mecanismo de sinergia terapéutica es distinto del bloqueo de anticuerpos CTLA-4 subyacente, el cual se dirige principalmente a las células efectoras, pero aumenta además las Treg. Por lo tanto, los tres enfoques juntos podrían resultar complementarios y lograr aún mayores niveles de inmunidad protectora tumoral.

Ejemplo 11: Secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica el polipéptido MFG-E8 de tipo silvestre murino (NM_008594, GI: 113865978)

Esta secuencia fue la secuencia de tipo silvestre usada para los experimentos de transferencia de genes mediados por retrovirus.

ES 2 629 749 T3

atgcaggctc cccgtgtgct ggccgcgctg tgcggcatgc tactctgcgc ctctggcctc
61 ttgcccgcgt ctggtgactt ctgtgactcc agcctgtgcc tgaacgggtg cacctgcttg
121 acgggccaag acaatgacat ctactgcctc tgcctgaag gcttcacagg ccttgtgtgc
181 aatgagactg agagaggacc atgctcccca aacccttget acaatgatgc caaatgtctg
241 gtgactttgg acacacagcg tggggacatc ttaccggaat acatctgcca gtgccctgtg
301 ggctactcgg gcatccactg tgaaccgag accaactact acaacctgga tggagaatac
361 atgttacca cagecgtccc caatactgcc gtccccacce cggccccac ccccgatct
421 tccaacaacc tagctcccg ttgtctaca cagctgggca tggaaagggg cgcattgtg
481 gattcacaga ttccgcctc gtctgtgat atgggttca tgggcttga gcgctggggc
541 ccggagctgg ctctgtgta ccgcacagg atcgtcaatg cctggacagc cagcaactat
601 gatagcaagc cctggatcca ggtgaacctt ctgcggaaga tgcgggtatc aggtgtgatg
661 acgcagggtg ccagccgtgc cgggagggcg gactacctga agacctcaa ggtggcttac
721 agcctcgacg gacgcaagt ttgattcacc caggatgaaa gcggtggaga caaggagttt
781 ttgggtaacc tggacaaca cagcctgaag gtaacatgt tcaaccgac tctggagga
841 cagtacataa agctgtacc ttttctgtc caccgaggct gcacctccg ctctgagctc
901 ctgggctgtg agttgcacgg atgtctgag ccctgggccc tgaagaataa cacaattct
961 gacagccaga tctcagcctc cagcagctac aagacatgga acctgcgtgc ttttggctgg
1021 tacccccact tgggaaggct ggataatcag ggcaagatca atgcctggac ggctcagagc
1081 aacagtcca aggaatggct gcaggttgac ctgggcactc agaggcaagt gacaggaatc
1141 atcaccagg gggcccgtga ctttggccac atccagtatg tggcgtccta caaggtagcc
1201 cacagtgatg atggtgtgca gtggactgta tatgaggagc aaggaagcag caaggtctc
1261 cagggcaact tggacaaca cteccacaag aagaacatct tggagaaacc ctctatggt
1321 cgctacgtgc gtgtcctcc agtgtctctg cataaccgca tcacctgag cctggagctg
1381 ctgggctgtt aa

Ejemplo 12: Aminoácido del polipéptido MFG-E8 de tipo silvestre murino (NM_008594, GI: 113865978)

5 MQVSRVLAALCGMLLCASGLFAASGDFCDSSLCLNNGGTCLTGQDND
 IYCLCPEGFTGLVCNETERGPCSPNPCYNDAKCLVTLDTQRGDIFTEYICQCP
 VGYSGIHCETETNYYNLDGEYMFTTAVPNTAVPTPAPTDLASNLASRCSTQ
 10 LGMEGGAIADSQISASSVYMGFMGLQRWGPPEARLYRTGIVNAWTASNYD
 SKPWIQVNLRLKMRVSGVMTQGASRAGRAEYLKTFKVAYS LDGRKFEFIQ
 DESGGDKEFLGNLDNNSLKVNMFNPTLEAQYIKLYPVSCHRGCTLRFELLG
 CELHGCSEPLGLKNNTIPDSQMSASSSYKTWNLRAFGWYPH LGRLDNQGKI
 15 NAWTAQSNSAKEWLQVDLGTQRQVTGII TQGARDFGHIQYVASYKVAHSD
 DGVQWTVYEEQSSKVFQGNLDNNSHKKNIFEKPFMARYVRVLPVSWHNR
 ITLRLELLGC
 20

Ejemplo 13: Secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica el polipéptido MFG-E8 murino mutante RGE (NM_008594, GI: 113865978)

25 Esta secuencia fue la secuencia RGE mutante usada para los experimentos de transferencia de genes mediados por retrovirus. La posición del residuo mutado (nucleótido 267) se muestra en letra mayúscula en negrita.

atgcaggtct cccgtgtgct ggccgcgctg tgcggcatgc tactctgccc ctctggcctc
 61 ttcgccgcgt ctggtgactt ctgtgactcc agcctgtgcc tgaacgggtgg cacctgcttg
 121 acgggccaag acaatgacat ctactgcctc tgcctgaag gcttcacagg ccttgtgtgc
 30 181aatgagactg agagaggacc atgetcccca aacctgtgt acaatgatgc caatgtctg
 241gtgacttgg acacacagcg tgggga**A**atc ttcaccgaat acatctgcca gtgcctgtg
 301ggctactcgg gcatccactg tgaaccgag accaactact acaactgga tggagaatac
 361atgttcaaca cagccgtccc caaactgccc gtcccaccc cggcccacc ccccgatctt
 35 421tcaacaacc tagctcccc ttgttctaca cagctgggca tggaggggg cgccatgct
 481gatteacaga ttccgcctc gtctgtgtat atgggttca tgggcttga gcgctggggc
 541ccggagctgg ctgctgtgta ccgcacaggg atcgtcaatg cctggacagc cagcaactat
 601gatagcaagc cctggatcca ggtgaacctt ctgcggaaga tgcgggtatc aggtgtgatg
 40 661acgcagggtg ccagccgtgc cgggagggcg gagtacctga agacctcaa ggtggcttac
 721agcctgcacg gacgcaagtt ttagttcctc caggatgaaa gcggtggaga caaggatgtt
 781ftgggtaacc tggacaaca cagcctgaag gtaacatgt tcaaccgac tctggaggca
 841cagtacataa agctgtacc tgttctgtc caccgcggct gcaccctccg cttcgagctc
 45 901ctgggctgtg agttgcacgg atgttctgag cccctgggcc tgaagaataa cacaattcct
 961gacagccaga tgtcagcctc cagcagctac aagacatgga acctgcgtgc ttttgctgg
 1021taccacctt tgggaaggct ggataatcag ggcaagatca atgcctggac ggctcagagc
 1081aacagtcca agaatggct gcaggtgac ctgggcactc agaggcaagt gacaggaatc
 1141atcaccagg gggcccgtga cttggccac atccagtatg tggcctcta caaggtagcc
 50 1201cacagtgatg atggtgtgca gtggactgta tatgaggagc aaggaagcag caaggtctc
 1261cagggcaact tggacaaca cccccacaag aagaacatct tggagaaacc cttcatggct
 1321cgctacgtgc gtgtcctcc agtgtcctgg cataaccgca tcacctgcg cctggagctg
 1381ctgggctgtt aa

55 Ejemplo 14: Aminoácido del polipéptido MFG-E8 mutante murino (NM_008594, GI: 113865978)

La posición del residuo mutado (aminoácido 89) se muestra en letra minúscula en negrita.

60

65

MQVSRVLAALCGMLLCASGLFAASGDFCDSSLCLNGGTCLTGQDND
 IYCLCPEGFTGLVCNETERGPCSPNPCYNDAKCLVTLDTQRGeIFTEYICQCP
 VGYSGIHCETETNYYNLDGEYMFTTAVPNTAVPTPAPTDLNNSLASRCSTQ
 LGMEGGAIADSQISASSVYMGFMGLQRWGPPEARLYRTGIVNAWTASNYD
 SKPWIQVNLLRKMVRVSGVMTQGASRAGRAEYLKTFKVAYS LDGRKFEFIQ
 DESGGDK EFLGNLDNNSLKVNMFNPTLEAQYIKLYPVSCHRGCTLRFELLG
 CELHGCSEPLGLKNNTIPDSQMSASSSYKTWNLRAFGWYPHLGRLDNQGI
 NAWTAQSNSAKEWLQVDLGTQRQVTGHIITQGARDFGHIQYVASYKVAHSD
 DGVQWTVYEEQGSSKVFQGNLDNNSHKKNIFEKPFMARYVRVLPVSWHNR
 ITLRLELLGC"

5

10

15

Ejemplo 15: Secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica el polipéptido MFG-E8 humano de tipo silvestre (NM_005928, GI: 5174556)

1 atgccgcgcc cccgcctgct gccgcgcctg tgcggcgcgc tgctctgcgc cccagcctc
 61 ctctgcgcc tggatatctg tccaaaaac cctgccaca acggtggttt atgcgaggag
 121 atticcaag aagtgcgagg agatgtctc cctcgtaca cctgcacgtg cctfaagggc
 181 tacgcgggca accactgtga gacgaaatg gtcgagccac tgggcatgga gaatgggaac
 241 attgccaact cacagatcgc cgcctcatc gtgcgtgtga cctctfggg ttgcagcat
 301 tgggtcccgg agctggcccg cctgaaccgc gcaggcatgg tcaatgcctg gacaccagc
 361 agcaatgacg ataaccctg gatccagggtg aacctgctgc ggaggatgtg ggtaacaggt
 421 gtggtgacgc agggtgccag cgcctfggc agtcatgagt acctgaaggc ctcaaggtg
 481 gcctacagcc ttaatggaca cgaattgat tcatccatg atgtaataa aaaacacaag
 541 gagtttggg gtaactggaa caaaaacgcg gtgcattgca acctgttga gacccctgtg
 601 gaggtcagt acgtgagatt gtaccccacg agctgccaca cggcctgcac tctgccttt
 661 gagtactgg gctgtgagct gaacggatgc gccaatccc tggcctgaa gaataacagc
 721 atccctgaca agcagatcac ggctccagc agctacaaga cctggggctt gcatctctc
 781 agctggaacc cctcctatgc acggctggac aagcagggca actcaacgc ctgggttgcg
 841 gggagctacg gtaacgatca gtgctgcag gtggacctg gctcctcga ggaggtgaca
 901 ggcatcatca cccagggggc ccgtaactt ggctctgtcc agtttgggc atcctacaag
 961 gttgctaca gtaatgacag tgcgaactg actgagtacc aggacccag gactggcagc
 1021 agtaagatc tcctggcaa ctgggacaac cactcccaca agaagaact gttgagacg
 1081 cccatcctg ctgctatgt gcgcatcct cctgtagcct ggcacaaccg catcgcctg
 1141 cgcctggagc tgctgggctg ttag

20

25

30

35

40

45

Ejemplo 16: Secuencia de aminoácidos del polipéptido MFG-E8 humano de tipo silvestre (NM_005928, GI: 5174556)

MPRPRLLAALCGALLCAPSLLVALDICSKNPCHNGGLCEEISQEVRG
 DVFPSYCTCLKGYAGNHCETKCV EPLGMENGNANSQIAASSVRVTFGLL
 QHWVPELARLN RAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLLRRMWVTGVVTQGA
 SRLASHEY LKAFKVAYS LNHGHEFDIHDVNKKHKEFVGNWNKNAVHVNLF
 ETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNNSIPDKQITA
 SSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFN AWWAGSYGNDQWLQVDLGSSK
 EVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYS NDSANWTEYQDPRTGSSKIFPGNW
 DNHSHKKNLFETPILARYVRILPVAWHNRIALRLELLGC

50

55

60

65

ES 2 629 749 T3

Ejemplo 17: Secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica del polipéptido MFG-E8 humano mutante RGE (NM_005928, GI: 5174556)

La posición del residuo mutado (nucleótido 144) se muestra en letra mayúscula en negrita.

5
1 atgccgcgcc cccgcctgct ggccgcgctg tgcggcgcgc tgcctcgcgc ccccagcctc
61 ctgctgccc tggatatctg ttccaaaaac cctgccaca acggtgggtt atgcgaggag
121 attccaag aagtgcgagg aga**A**gtcttc cctcgtaca cctgcacgtg ccttaagggc
10 181 tacgcgggca accactgtga gacgaaatgt gtcgagccac tgggcatgga gaatgggaac
241 attgccaact cacagatcgc cgcctcatct gtgcgtgtga cctctfggg tttgcagcat
301 tgggtcccgg agctggcccc cctgaaccgc gcaggcatgg tcaatgcctg gacaccagc
361 agcaatgacg ataaccctg gatccagggtg aacctgctgc ggaggatgtg ggtaacaggt
421 gtggtgacgc aggtgtccag ccgcttgccc agtcatgagt acctgaagge ctcaaggtg
15 481 gcctacagcc ttaatggaca cgaattgat tcatccatg atgtaataa aaaacacaag
541 gagttgtgg gtaactgaa caaaaacgcg gtgcattca acctgftga gacctgtg
601 gagctcagt acgtgagatt gtaccccacg agctgccaca cgacctgac tctgccttt
661 gagtactgg gctgtgagct gaacggatgc gccaatccc tgggctgaa gaataacagc
20 721 atccctgaca agcagatcac ggctccagc agctacaaga cctggggctt gcactcttc
781 agctggaacc cctcctatgc acggtggac aagcagggca actcaacgc ctgggtgag
841 gggagctacg gtaacgatca gtggctgag gtggacctgg gctcctgaa ggaggtgaca
901 ggcatcatca cccagggggc ccgtaacttt ggctctgtcc agttgtgga atcctacaag
25 961 gttgcctaca gtaatgacag tgcgaactgg actgagtacc aggaccccag gactggcagc
1021 agtaagatct tccctggcaa ctgggacaac cactcccaca agaagaactt gttgagacg
1081 cccatcctgg ctgctatgt gcgcatcctg cctgtagcct ggcacaaccg catgcctctg
1141 cgctgggagc tgctgggctg ttag

30 Ejemplo 18: Secuencia de aminoácidos del polipéptido MFG-E8 humano mutante RGE (NM_005928, GI: 5174556)

La posición del residuo mutado (aminoácido 48) se muestra en letra minúscula en negrita.

35 MPRPRLAALCGALLCAPSLLVALDICKSNPCHNGGLCEEISQEVRe
VFPSYCTCKGYAGNHCETKCV EPLGMENGNANSQIAASSVRVTFGLQ
HWVPELARLN RAGMVNAWTPSSNDNPWIQVNLLRRMWVTGVVTQGAS
40 RLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDIFIHDVNKKHKEFVGNWNKNAVHVNLF
TPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNSIPDKQITASS
SYKTWGLHLFSWNPYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEV
45 TGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSND SANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDN
HSHKKNLFETPILARYVRILPVAWHNRIALRLELLGC

50 Se ha descrito un número de modalidades de la invención. No obstante, debe entenderse que se realizaron varias modificaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

5 <120> INMUNIDAD TUMORAL

<130> 39786-0002EP2
 <140> 07843837.1
 <141> 2007-10-04

10 <140> PCT/US2007/080446
 <141> 2007-10-04
 <150> 60/828,177
 <151> 2006-10-04

15 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 9

20 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 1

25 Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
 1 5

30 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Adenovirus humano

35 <400> 2

Ser Gly Pro Ser Asn Thr Pro Pro Glu Ile
 1 5 10

40 <210> 3
 <211> 1392
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

45 <400> 3

atgcaggtct cccgtgtgct ggccgcgctg tgcggcatgc tactctgccc ctctggcctc	60
ttcgccgcgt ctggtgactt ctgtgactcc agcctgtgcc tgaacgggtgg cacctgcttg	120
acgggccaag acaatgacat ctactgcctc tgcctgaag gcttcacagg ccttgtgtgc	180
aatgagactg agagaggacc atgctcccca aacccttgct acaatgatgc caaatgtctg	240
gtgactttgg acacacagcg tggggacatc ttcaccgaat acatctgcca gtgccctgtg	300
ggctactcgg gcatccactg tgaaaccgag accaactact acaacctgga tggagaatac	360
atgttcacca cagccgtccc caatactgcc gtccccaccc cggccccccac ccccgatctt	420
tccaacaacc tagcctcccg ttgttctaca cagctgggca tgggaaggggg cgccattgct	480

65

ES 2 629 749 T3

gattcacaga ttccgcctc gtctgtgat atgggtttca tgggottgca gogctggggc 540
 ccggagctgg ctctctgta ccgcacaggg atcgtcaatg cctggacagc cagcaactat 600
 5 gatagcaagc cctggatcca ggtgaacctt ctgcggaaga tgcgggtatc aggtgtgatg 660
 acgcaggggtg ccagccgtgc cgggagggcg gagtacctga agaccttcaa ggtggcttac 720
 agcctcgacg gacgcaagtt tgagttcatc caggatgaaa gcgggtggaga caaggagttt 780
 10 ttgggtaacc tggacaacaa cagcctgaag gttaacatgt tcaacccgac tctggaggca 840
 cagtacataa agctgtaccc tgtttctgtc caccgcggct gcaccctccg cttcgagctc 900
 ctgggctgtg agttgcacgg atgttctgag cccctgggcc tgaagaataa cacaattcct 960
 15 gacagccaga tgtcagcctc cagcagctac aagacatgga acctgcgtgc ttttggctgg 1020
 tacccccact tgggaaggct ggataatcag ggcaagatca atgcctggac ggctcagagc 1080
 20 aacagtgcc aaggaatggct gcaggttgac ctgggcactc agaggcaagt gacaggaatc 1140
 atcaccagg gggccctgta ctttggccac atccagtatg tggcgtccta caaggtagcc 1200
 cacagtgatg atggtgtgca gtggactgta tatgaggagc aaggaagcag caaggtcttc 1260
 25 cagggcaact tggacaacaa ctcccacaag aagaacatct tcgagaaacc cttcatggct 1320
 cgctacgtgc gtgtccttcc agtgtcctgg cataaccgca tcaccctgag cctggagctg 1380
 30 ctgggctggt aa 1392

<210> 4
 <211> 463
 <212> PRT
 35 <213> Mus musculus

<400> 4
 Met Gln Val Ser Arg Val Leu Ala Ala Leu Cys Gly Met Leu Leu Cys
 40 1 5 10 15
 Ala Ser Gly Leu Phe Ala Ala Ser Gly Asp Phe Cys Asp Ser Ser Leu
 45 20 25 30
 Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Leu Thr Gly Gln Asp Asn Asp Ile Tyr
 50 35 40 45
 Cys Leu Cys Pro Glu Gly Phe Thr Gly Leu Val Cys Asn Glu Thr Glu
 55 50 55 60
 Arg Gly Pro Cys Ser Pro Asn Pro Cys Tyr Asn Asp Ala Lys Cys Leu
 65 70 75 80
 Val Thr Leu Asp Thr Gln Arg Gly Asp Ile Phe Thr Glu Tyr Ile Cys
 85 90 95
 60 Gln Cys Pro Val Gly Tyr Ser Gly Ile His Cys Glu Thr Glu Thr Asn

65

ES 2 629 749 T3

			100					105					110			
5	Tyr	Tyr	Asn 115	Leu	Asp	Gly	Glu	Tyr 120	Met	Phe	Thr	Thr	Ala 125	Val	Pro	Asn
	Thr	Ala	Val 130	Pro	Thr	Pro	Ala 135	Pro	Thr	Pro	Asp	Leu 140	Ser	Asn	Asn	Leu
10	Ala	Ser	Arg	Cys	Ser	Thr	Gln 150	Leu	Gly	Met	Glu 155	Gly	Gly	Ala	Ile	Ala 160
15	Asp	Ser	Gln	Ile	Ser 165	Ala	Ser	Ser	Val	Tyr 170	Met	Gly	Phe	Met	Gly 175	Leu
20	Gln	Arg	Trp	Gly 180	Pro	Glu	Leu	Ala	Arg 185	Leu	Tyr	Arg	Thr	Gly 190	Ile	Val
	Asn	Ala	Trp 195	Thr	Ala	Ser	Asn	Tyr 200	Asp	Ser	Lys	Pro	Trp 205	Ile	Gln	Val
25	Asn	Leu	Leu	Arg	Lys	Met	Arg 215	Val	Ser	Gly	Val	Met 220	Thr	Gln	Gly	Ala
30	Ser	Arg	Ala	Gly	Arg	Ala 230	Glu	Tyr	Leu	Lys	Thr 235	Phe	Lys	Val	Ala	Tyr 240
35	Ser	Leu	Asp	Gly	Arg 245	Lys	Phe	Glu	Phe	Ile 250	Gln	Asp	Glu	Ser	Gly 255	Gly
	Asp	Lys	Glu	Phe 260	Leu	Gly	Asn	Leu	Asp 265	Asn	Asn	Ser	Leu	Lys 270	Val	Asn
40	Met	Phe	Asn 275	Pro	Thr	Leu	Glu	Ala 280	Gln	Tyr	Ile	Lys	Leu 285	Tyr	Pro	Val
45	Ser	Cys	His 290	Arg	Gly	Cys	Thr 295	Leu	Arg	Phe	Glu	Leu	Leu 300	Gly	Cys	Glu
	Leu	His	Gly	Cys	Ser	Glu 310	Pro	Leu	Gly	Leu	Lys 315	Asn	Asn	Thr	Ile	Pro 320
50	Asp	Ser	Gln	Met	Ser 325	Ala	Ser	Ser	Ser	Tyr 330	Lys	Thr	Trp	Asn	Leu 335	Arg
55	Ala	Phe	Gly	Trp 340	Tyr	Pro	His	Leu	Gly 345	Arg	Leu	Asp	Asn	Gln 350	Gly	Lys

60

65

ES 2 629 749 T3

Ile Asn Ala Trp Thr Ala Gln Ser Asn Ser Ala Lys Glu Trp Leu Gln
 355 360 365

5 Val Asp Leu Gly Thr Gln Arg Gln Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly
 370 375 380

10 Ala Arg Asp Phe Gly His Ile Gln Tyr Val Ala Ser Tyr Lys Val Ala
 385 390 395 400

15 His Ser Asp Asp Gly Val Gln Trp Thr Val Tyr Glu Glu Gln Gly Ser
 405 410 415

20 Ser Lys Val Phe Gln Gly Asn Leu Asp Asn Asn Ser His Lys Lys Asn
 420 425 430

25 Ile Phe Glu Lys Pro Phe Met Ala Arg Tyr Val Arg Val Leu Pro Val
 435 440 445

Ser Trp His Asn Arg Ile Thr Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys
 450 455 460

<210> 5
 <211> 1392
 <212> ADN
 30 <213> Mus musculus
 <400> 5

atgcaggtct cccgtgtgct ggccgcgctg tgcggcatgc tactctgcgc ctctggcctc 60
 35 ttccgccgct ctggtgactt ctgtgactcc agcctgtgcc tgaacggtag cacctgcttg 120
 acgggccaag acaatgacat ctactgcctc tgcctgaaag gcttcacagg ccttgtgtgc 180
 40 aatgagactg agagaggacc atgctcccca aacccttgc tacaatgatgc caaatgtctg 240
 gtgactttgg acacacagcg tggggaaatc ttcaccgaat acatctgcca gtgccctgtg 300
 ggctactcgg gcatccactg tgaaacggag accaactact acaacctgga tggagaatac 360
 45 atgttcacca cagccgtccc caatactgcc gtccccacc cggccccac ccccgatctt 420
 tccaacaacc tagcctcccg ttgtttaca cagctgggca tggaaagggg cgccattgct 480
 gattcacaga tttccgcctc gtctgtgtat atgggtttca tgggcttgca gcgctggggc 540
 50 ccggagctgg ctgctctgta ccgcacaggg atcgtcaatg cctggacagc cagcaactat 600
 gatagcaagc cctggatcca ggtgaacctt ctgcggaaga tgcgggtatc aggtgtgatg 660
 acgcagggtg ccagccgtgc cgggagggcg gagtacctga agacctcaa ggtggcttac 720
 55 agcctcgacg gacgcaagtt tgagttcatc caggatgaaa gcggtggaga caaggagttt 780
 ttgggtaacc tggacaacaa cagcctgaag gttaacatgt tcaaccggac tctggaggca 840
 60 cagtacataa agctgtacct tgtttcgtgc caccgcggct gcaccctccg cttcgagctc 900

65

ES 2 629 749 T3

ctgggctgtg agttgcacgg atgttctgag ccctctggcc tgaagaataa cacaattcct 960
gacagccaga tgtcagcctc cagcagctac aagacatgga acctgcgtgc ttttggtg 1020
5 taccceact tgggaaggct ggataatcag ggcaagatca atgcctggac ggctcagagc 1080
aacagtgcc aaggaatggct gcagggtgac ctgggactc agaggcaagt gacaggaatc 1140
atcaccagg gggcccgtga ctttgccac atccagtatg tggcgtccta caaggtagcc 1200
10 cacagtgatg atggtgtgca gtggactgta tatgaggagc aaggaagcag caaggtcttc 1260
cagggcaact tggacaaca ctcccacaag aagaacatct tcgagaaacc cttcatggct 1320
cgctacgtgc gtgtccttcc agtgtcctgg cataaccgca tcaccctgcg cctggagctg 1380
15 ctgggctggt aa 1392

<210> 6
<211> 463
20 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6
25 Met Gln Val Ser Arg Val Leu Ala Ala Leu Cys Gly Met Leu Leu Cys
1 5 10 15
Ala Ser Gly Leu Phe Ala Ala Ser Gly Asp Phe Cys Asp Ser Ser Leu
30 20 25 30
Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Leu Thr Gly Gln Asp Asn Asp Ile Tyr
35 35 40 45
Cys Leu Cys Pro Glu Gly Phe Thr Gly Leu Val Cys Asn Glu Thr Glu
50 50 55 60
Arg Gly Pro Cys Ser Pro Asn Pro Cys Tyr Asn Asp Ala Lys Cys Leu
40 65 70 75 80
Val Thr Leu Asp Thr Gln Arg Gly Glu Ile Phe Thr Glu Tyr Ile Cys
45 85 90 95
Gln Cys Pro Val Gly Tyr Ser Gly Ile His Cys Glu Thr Glu Thr Asn
100 105 110
50 Tyr Tyr Asn Leu Asp Gly Glu Tyr Met Phe Thr Thr Ala Val Pro Asn
115 120 125
Thr Ala Val Pro Thr Pro Ala Pro Thr Pro Asp Leu Ser Asn Asn Leu
55 130 135 140
Ala Ser Arg Cys Ser Thr Gln Leu Gly Met Glu Gly Gly Ala Ile Ala

60

65

ES 2 629 749 T3

```

145                      150                      155                      160

5   Asp Ser Gln Ile Ser Ala Ser Ser Val Tyr Met Gly Phe Met Gly Leu
      165                      170                      175

      Gln Arg Trp Gly Pro Glu Leu Ala Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Ile Val
      180                      185                      190

10  Asn Ala Trp Thr Ala Ser Asn Tyr Asp Ser Lys Pro Trp Ile Gln Val
      195                      200                      205

15  Asn Leu Leu Arg Lys Met Arg Val Ser Gly Val Met Thr Gln Gly Ala
      210                      215                      220

      Ser Arg Ala Gly Arg Ala Glu Tyr Leu Lys Thr Phe Lys Val Ala Tyr
      225                      230                      235                      240

20  Ser Leu Asp Gly Arg Lys Phe Glu Phe Ile Gln Asp Glu Ser Gly Gly
      245                      250                      255

25  Asp Lys Glu Phe Leu Gly Asn Leu Asp Asn Asn Ser Leu Lys Val Asn
      260                      265                      270

30  Met Phe Asn Pro Thr Leu Glu Ala Gln Tyr Ile Lys Leu Tyr Pro Val
      275                      280                      285

      Ser Cys His Arg Gly Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly Cys Glu
      290                      295                      300

35  Leu His Gly Cys Ser Glu Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Thr Ile Pro
      305                      310                      315                      320

40  Asp Ser Gln Met Ser Ala Ser Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Asn Leu Arg
      325                      330                      335

45  Ala Phe Gly Trp Tyr Pro His Leu Gly Arg Leu Asp Asn Gln Gly Lys
      340                      345                      350

      Ile Asn Ala Trp Thr Ala Gln Ser Asn Ser Ala Lys Glu Trp Leu Gln
      355                      360                      365

50  Val Asp Leu Gly Thr Gln Arg Gln Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly
      370                      375                      380

55  Ala Arg Asp Phe Gly His Ile Gln Tyr Val Ala Ser Tyr Lys Val Ala
      385                      390                      395                      400

60

65

```

ES 2 629 749 T3

His Ser Asp Asp Gly Val Gln Trp Thr Val Tyr Glu Glu Gln Gly Ser
 405 410 415

5 Ser Lys Val Phe Gln Gly Asn Leu Asp Asn Asn Ser His Lys Lys Asn
 420 425 430

10 Ile Phe Glu Lys Pro Phe Met Ala Arg Tyr Val Arg Val Leu Pro Val
 435 440 445

15 Ser Trp His Asn Arg Ile Thr Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys
 450 455 460

15

<210> 7
 <211> 1164
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20

<400> 7

25

atgccgcgcc cccgcctgct ggccgcgctg tgcggcgcgc tgctctgcgc ccccagcctc 60

ctcgtcgccc tggatatctg ttcaaaaac ccctgccaca acggtggttt atgcgaggag 120

atthcccaag aagtgcgagg agatgtcttc ccctcgtaca cctgcacgtg ccttaagggc 180

30

tacgcgggca accactgtga gacgaaatgt gtcgagccac tgggcatgga gaatgggaac 240

attgccaaact cacagatcgc cgcctcatct gtgcgtgtga ccttcttggg tttgcagcat 300

tgggtcccgg agctggcccg cctgaaccgc gcaggcatgg tcaatgcctg gacaccagc 360

35

agcaatgacg ataaccctcg gatccagggtg aacctgctgc ggaggatgtg ggtaacaggt 420

gtggtgacgc aggggtgccag ccgcttggcc agtcatgagt acctgaaggc cttcaagggtg 480

gcctacagcc ttaatggaca cgaattogat ttcatccatg atgttaataa aaaacacaag 540

40

gagtttgtgg gtaactggaa caaaaacgcg gtgcatgtca acctgtttga gaccctgtg 600

gaggctcagt acgtgagatt gtaccccacg agctgccaca cggcctgcac tctgcgcttt 660

45

gagctactgg gctgtgagct gaacggatgc gccaatcccc tgggcctgaa gaataacagc 720

atccctgaca agcagatcac ggcctccagc agctacaaga cctggggctt gcatctcttc 780

agctggaacc cctcctatgc acggctggac aagcagggca acttcaacgc ctgggttgcg 840

50

gggagctacg gtaacgatca gtggctgcag gtggacctgg gctcctcgaa ggaggtgaca 900

ggcatcatca cccagggggc ccgtaacttt ggctctgtcc agtttgtggc atcctacaag 960

gttgccctaca gtaatgacag tgcgaactgg actgagtacc aggaccccag gactggcagc 1020

55

agtaagatct tccttgcaa ctgggacaac cactcccaca agaagaactt gtttgagacg 1080

cccacctcctgg ctcgctatgt gcgcatcctg cctgtagcct ggcaacaacc catcgccctg 1140

cgccctggagc tgctgggctg ttag 1164

60

<210> 8
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

65

ES 2 629 749 T3

<400> 8

5 Met Pro Arg Pro Arg Leu Leu Ala Ala Leu Cys Gly Ala Leu Leu Cys
 1 5 10 15
 Ala Pro Ser Leu Leu Val Ala Leu Asp Ile Cys Ser Lys Asn Pro Cys
 20 25 30
 10 His Asn Gly Gly Leu Cys Glu Glu Ile Ser Gln Glu Val Arg Gly Asp
 35 40 45
 Val Phe Pro Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Lys Gly Tyr Ala Gly Asn
 50 55 60
 His Cys Glu Thr Lys Cys Val Glu Pro Leu Gly Met Glu Asn Gly Asn
 65 70 75 80
 20 Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala Ala Ser Ser Val Arg Val Thr Phe Leu
 85 90 95
 25 Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu Ala Arg Leu Asn Arg Ala Gly
 100 105 110
 Met Val Asn Ala Trp Thr Pro Ser Ser Asn Asp Asp Asn Pro Trp Ile
 115 120 125
 30 Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp Val Thr Gly Val Val Thr Gln
 130 135 140
 35 Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu Tyr Leu Lys Ala Phe Lys Val
 145 150 155 160
 40 Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe Asp Phe Ile His Asp Val Asn
 165 170 175
 Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn Trp Asn Lys Asn Ala Val His
 180 185 190
 45 Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr
 195 200 205
 50 Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly
 210 215 220
 55 Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala Asn Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Ser

ES 2 629 749 T3

	225		230		235		240
5	Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr Ala Ser Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Gly		245		250		255
	Leu His Leu Phe Ser Trp Asn Pro Ser Tyr Ala Arg Leu Asp Lys Gln		260		265		270
10	Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val Ala Gly Ser Tyr Gly Asn Asp Gln Trp		275		280		285
15	Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser Ser Lys Glu Val Thr Gly Ile Ile Thr		290		295		300
20	Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly Ser Val Gln Phe Val Ala Ser Tyr Lys		305		310		315
	Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser Ala Asn Trp Thr Glu Tyr Gln Asp Pro		325		330		335
25	Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile Phe Pro Gly Asn Trp Asp Asn His Ser		340		345		350
30	His Lys Lys Asn Leu Phe Glu Thr Pro Ile Leu Ala Arg Tyr Val Arg		355		360		365
35	Ile Leu Pro Val Ala Trp His Asn Arg Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu		370		375		380
	Leu Gly Cys		385				
40	<210> 9						
	<211> 1164						
	<212> ADN						
	<213> Homo sapiens						
45	<400> 9						
	atgccgcgcc cccgcctgct ggccgcgctg tgcggcgcgc tgctctgcgc cccagcctc						60
50	ctcgtcgcgc tggatatctg ttccaaaaac ccctgccaca acggtgggtt atgcgaggag						120
	atttcccaag aagtgcgagg agaagtcttc ccctcgtaca cctgcacgtg ccttaagggc						180
	tacgcgggca accactgtga gacgaaatgt gtcgagccac tgggcatgga gaatgggaac						240
55	attgccaact cacagatcgc cgcctcatct gtgcgtgtga ccttcttggg tttgcagcat						300
	tgggtcccgg agctggcccg cctgaaccgc gcaggcatgg tcaatgcctg gacaccagc						360
60	agcaatgacg ataaccctg gatccaggtg aacctgctgc ggaggatgtg ggtaacaggt						420
65							

ES 2 629 749 T3

gtggtgacgc aggggtgccag ccgcttggcc agtcatgagt acctgaaggc cttcaaggtg 480
 gcctacagcc ttaatggaca cgaattcgat ttcattccatg atgttaataa aaaacacaag 540
 5 gagtttgtgg gtaactggaa caaaaacgcg gtgcatgtca acctgtttga gaccctgtg 600
 gaggctcagt acgtgagatt gtacccacag agctgccaca cggcctgcac tctgcgcttt 660
 gagctactgg gctgtgagct gaacggatgc gccaatcccc tgggocctgaa gaataacagc 720
 10 atccctgaca agcagatcac ggctccagc agctacaaga cctggggctt gcattctctt 780
 agctggaacc cctcctatgc acggctggac aagcagggca acttcaacgc ctgggttgcg 840
 gggagctacg gtaacgatca gtggctgcag gtggacctgg gctcctcgaa ggaggtgaca 900
 ggcatcatca cccagggggc ccgtaacttt ggctctgtcc agtttgtggc atcctacaag 960
 gttgcctaca gtaatgacag tgcgaactgg actgagtacc aggacccag gactggcagc 1020
 20 agtaagatct tccctggcaa ctgggacaac cactcccaca agaagaactt gtttgagacg 1080
 cccatcctgg ctgctatgt gcgcatcctg cctgtagcct ggcacaaccg catcgccctg 1140
 cgctgggagc tgctgggctg ttag 1164

25 <210> 10
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 10

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

65

ES 2 629 749 T3

Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp Val Thr Gly Val Val Thr Gln
 130 135 140

5
 Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu Tyr Leu Lys Ala Phe Lys Val
 145 150 155 160

10
 Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe Asp Phe Ile His Asp Val Asn
 165 170 175

15
 Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn Trp Asn Lys Asn Ala Val His
 180 185 190

20
 Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr
 195 200 205

25
 Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly
 210 215 220

30
 Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala Asn Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Ser
 225 230 235 240

35
 Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr Ala Ser Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Gly
 245 250 255

40
 Leu His Leu Phe Ser Trp Asn Pro Ser Tyr Ala Arg Leu Asp Lys Gln
 260 265 270

45
 Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val Ala Gly Ser Tyr Gly Asn Asp Gln Trp
 275 280 285

50
 Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser Ser Lys Glu Val Thr Gly Ile Ile Thr
 290 295 300

55
 Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly Ser Val Gln Phe Val Ala Ser Tyr Lys
 305 310 315 320

60
 Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser Ala Asn Trp Thr Glu Tyr Gln Asp Pro
 325 330 335

Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile Phe Pro Gly Asn Trp Asp Asn His Ser
 340 345 350

His Lys Lys Asn Leu Phe Glu Thr Pro Ile Leu Ala Arg Tyr Val Arg
 355 360 365

Ile Leu Pro Val Ala Trp His Asn Arg Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu
 370 375 380

Leu Gly Cys
 385

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición que comprende un inhibidor de MFG-E8 y GM-CSF, en donde el inhibidor de MFG-E8 interfiere con la unión de MFG-E8 a una integrina o a la fosfatidilserina expresada en la superficie de una célula.
- 10 2. Una composición de conformidad con la reivindicación 1, que comprende además uno o más antígenos de células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria contra un tumor.
- 15 3. La composición de conformidad con la reivindicación 1 o 2, que comprende además un anticuerpo dirigido contra CTLA-4.
- 20 4. La composición de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde el inhibidor de MFG-E8 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-MFG-E8, un anticuerpo anti-fosfatidilserina, un polipéptido MFG-E8 que carece de la capacidad para unirse a integrinas; y un polipéptido MFG-E8 que carece de la capacidad de unirse a fosfatidilserina.
- 25 5. La composición de conformidad con la reivindicación 3, en donde el anticuerpo dirigido contra CTLA-4 es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena única o un fragmento Fab.
- 30 6. La composición de conformidad con la reivindicación 2, en donde el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en antígeno carcinoembrionario (CEA), RAGE, MART (antígeno de melanoma), MAGE (antígeno de melanoma) 1-4, 6 y 12, MUC (mucina) (por ejemplo, MUC-1, MUC-2, etcétera), tirosinasa, Pmel 17 (gp100), secuencia V intrónica de GnT-V (secuencia V intrónica de N-acetilglucosaamiltransferasa V), psm del cáncer de próstata, PRAME (antígeno de melanoma), β -catenina, MUM-1-B (producto génico mutante ubicuo de melanoma), GAGE (antígeno del melanoma) 1, BAGE (antígeno de melanoma) 2-10, c-ERB2 (Her2/neu), EBNA (antígeno nuclear del virus Epstein-Barr) 1-6, gp75, virus del papiloma humano (HPV) E6 y E7, p53, proteína de resistencia pulmonar (LRP), Bcl-2, antígeno prostático específico (PSA) y Ki-67.
- 35 7. La composición de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde el inhibidor de MFG-E8 es un anticuerpo anti-MFG-E8 para su uso en el tratamiento del cáncer en donde dicho cáncer se caracteriza por expresar MFG-E8.
8. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento del cáncer.
9. La composición de conformidad con la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento del melanoma.

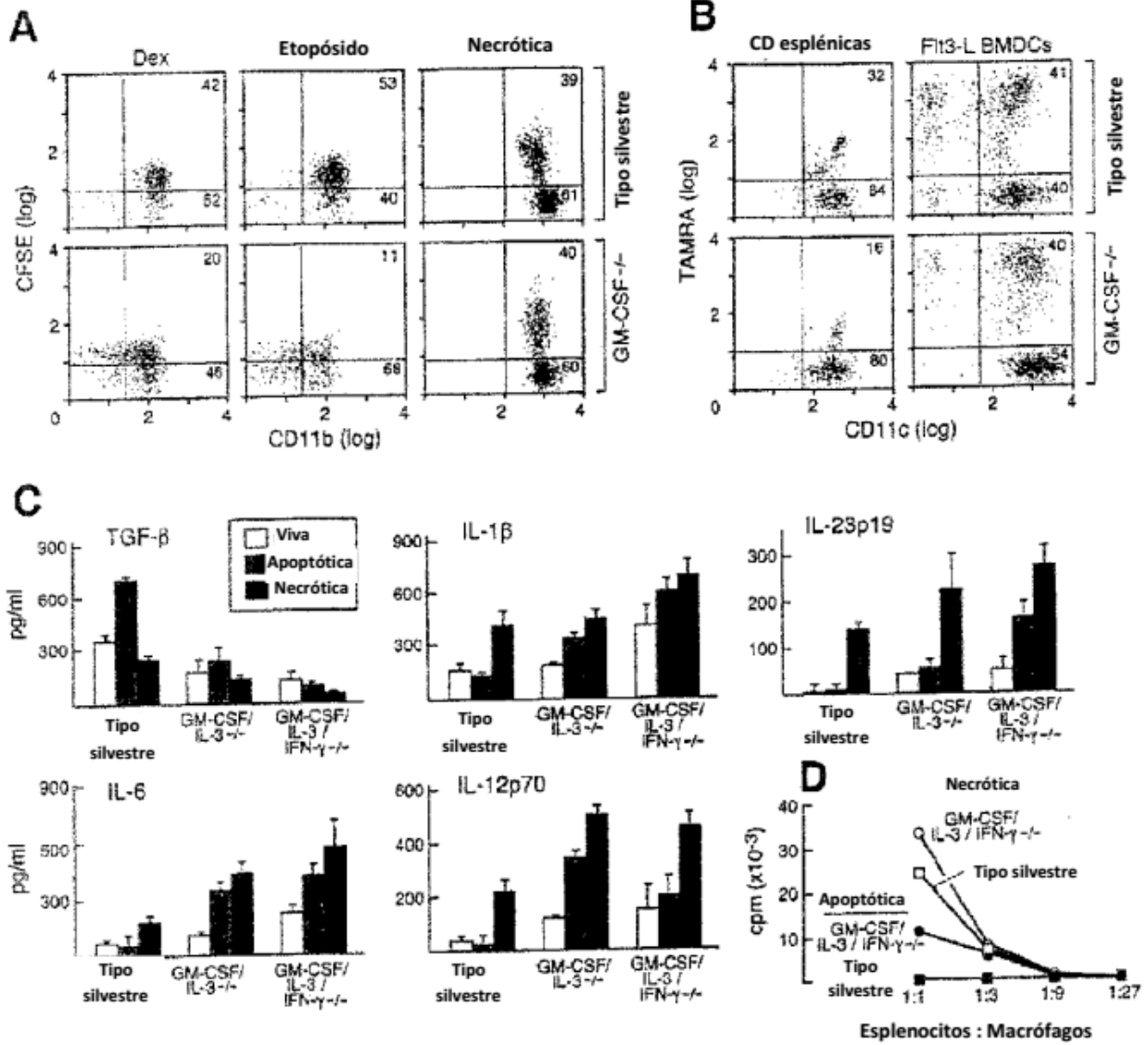


Figura 1

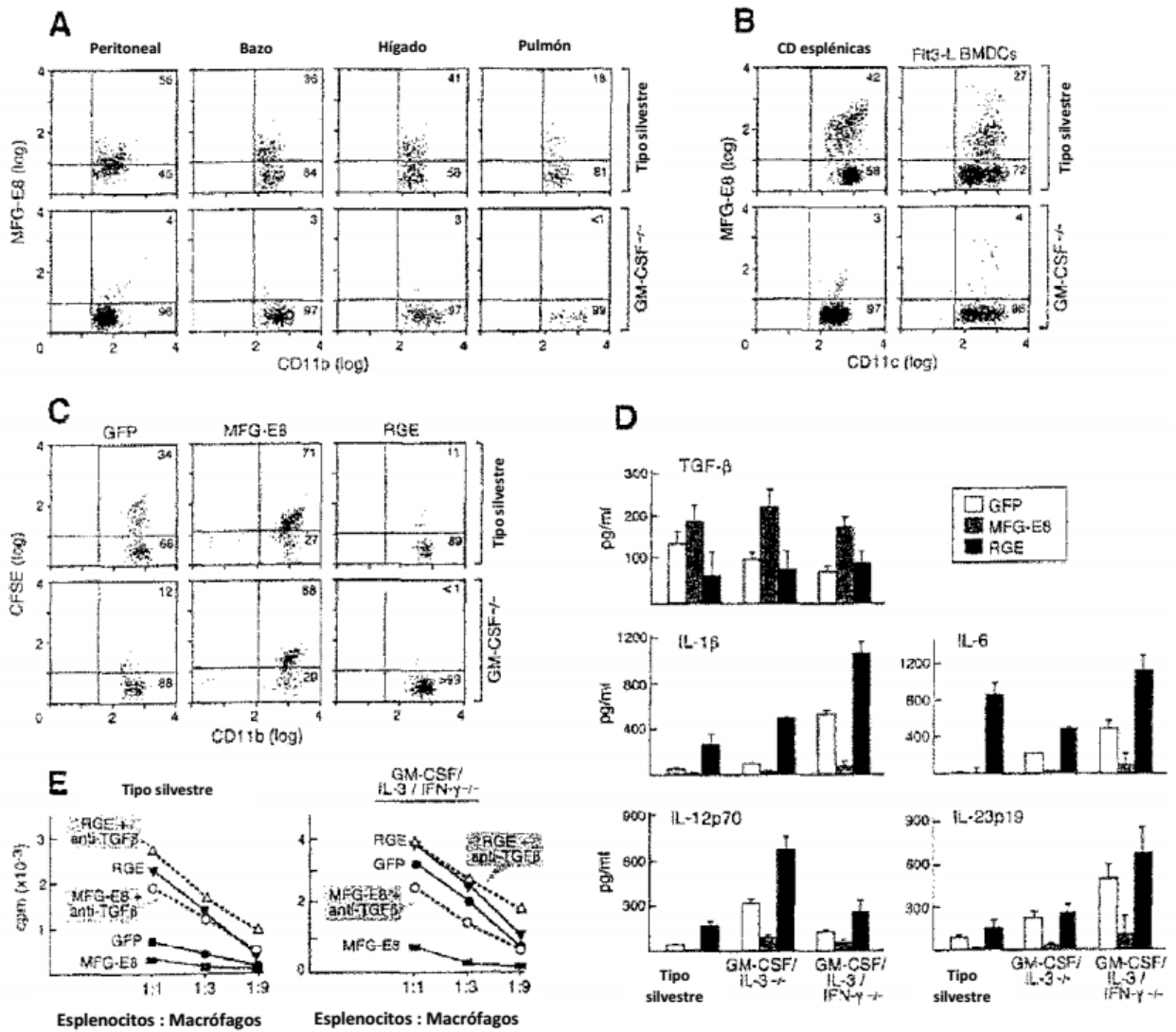


Figura 2

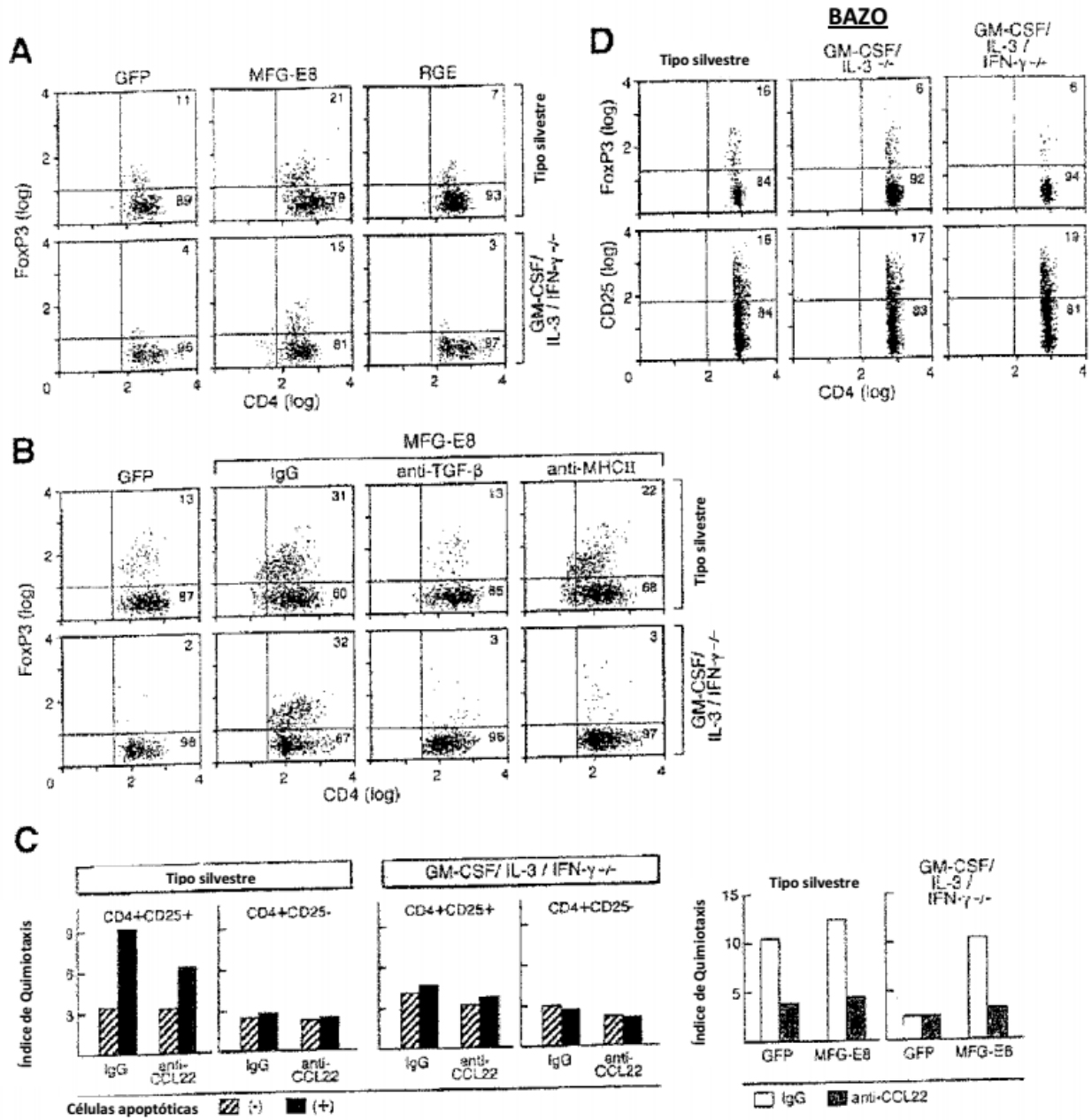


Figura 3

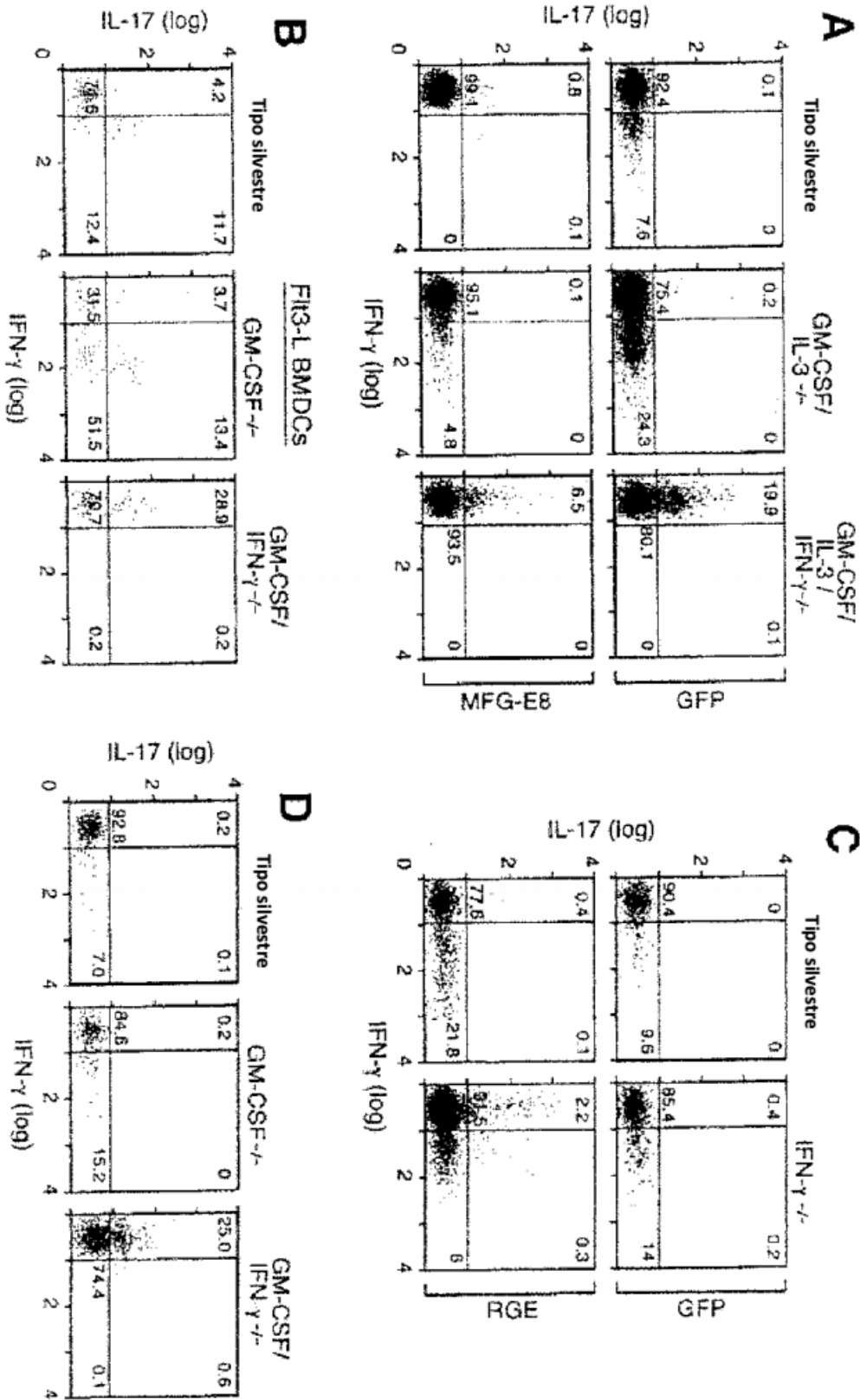
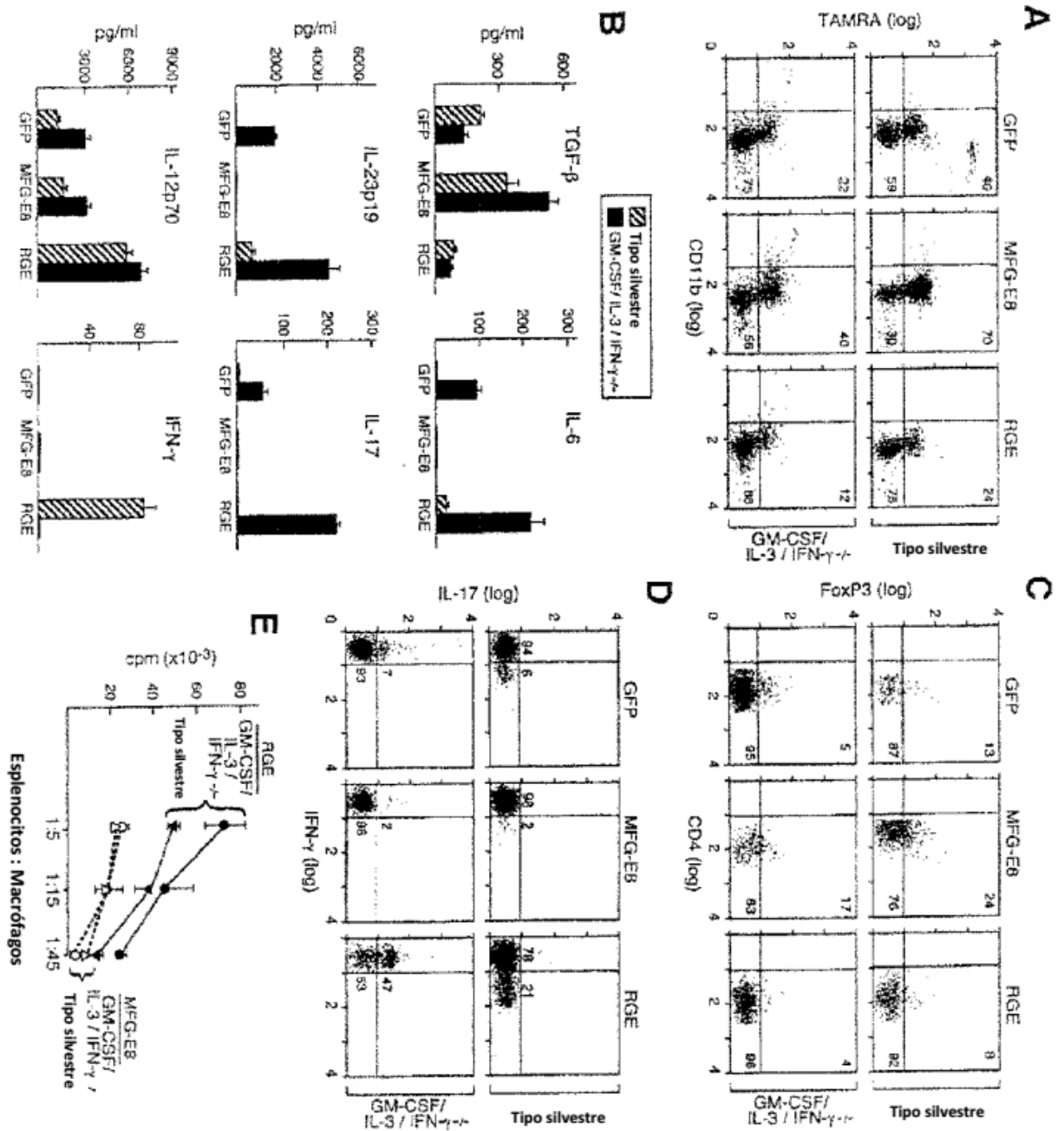


Figura 4



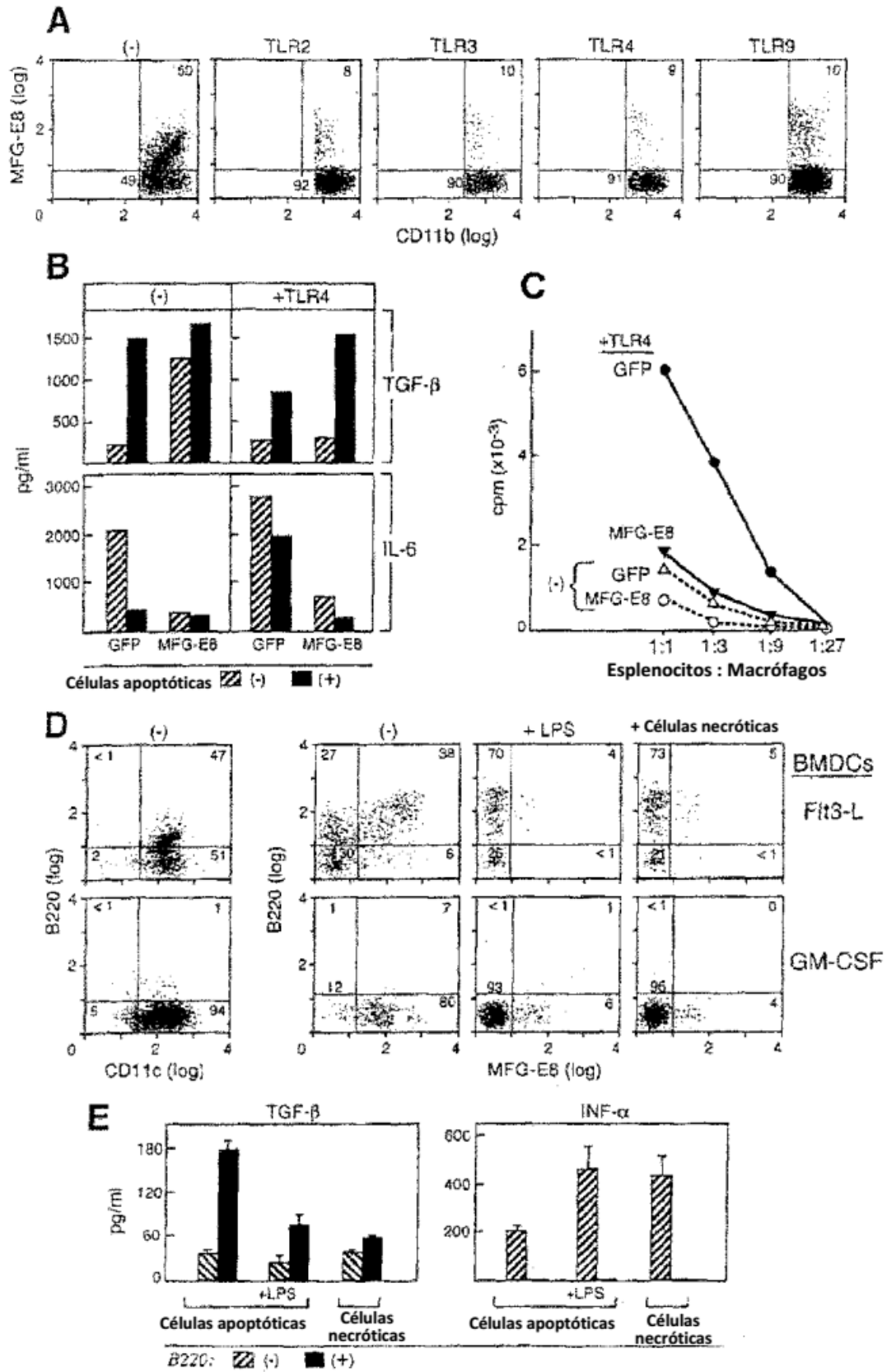


Figura 6

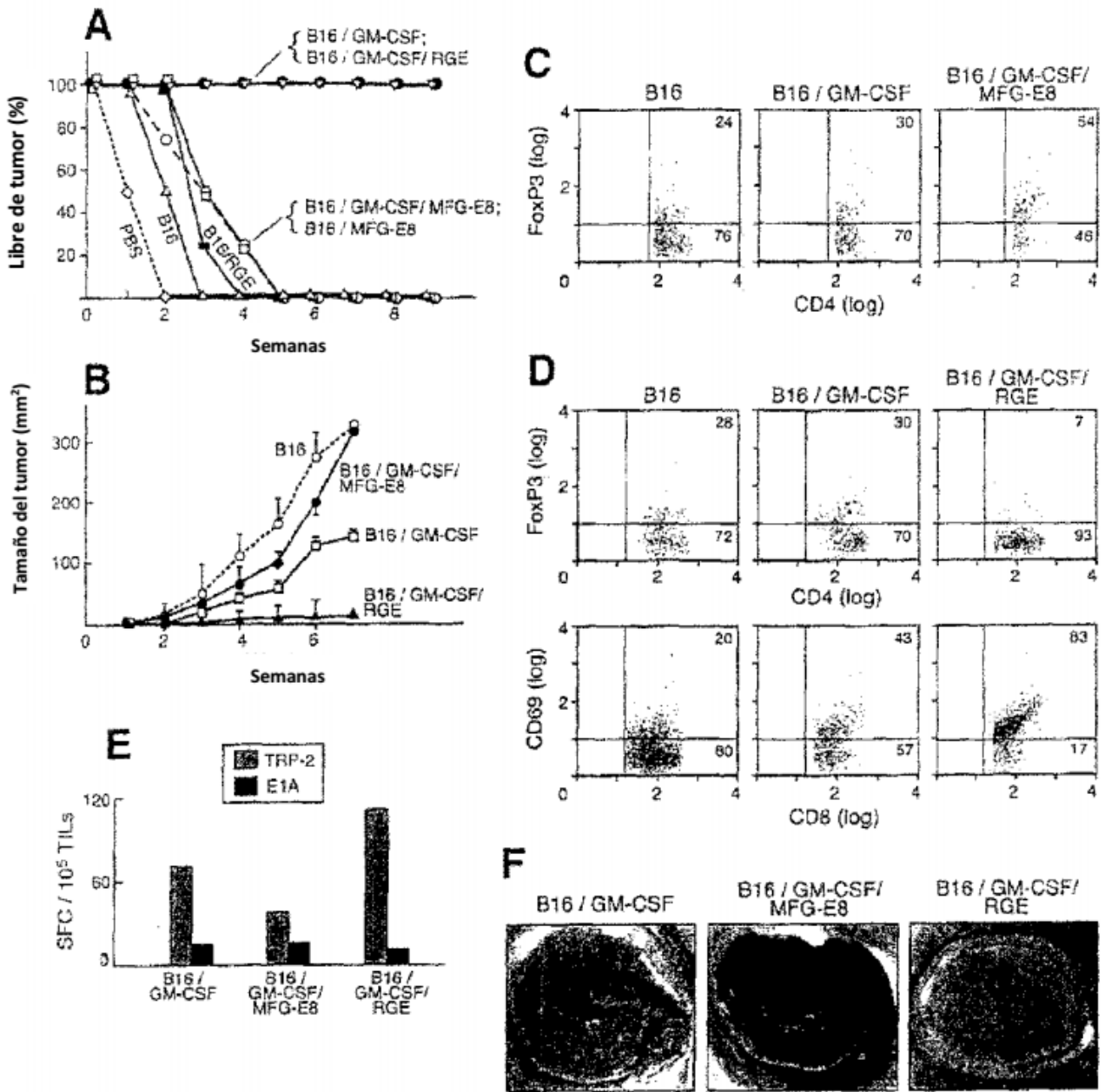


Figura 7

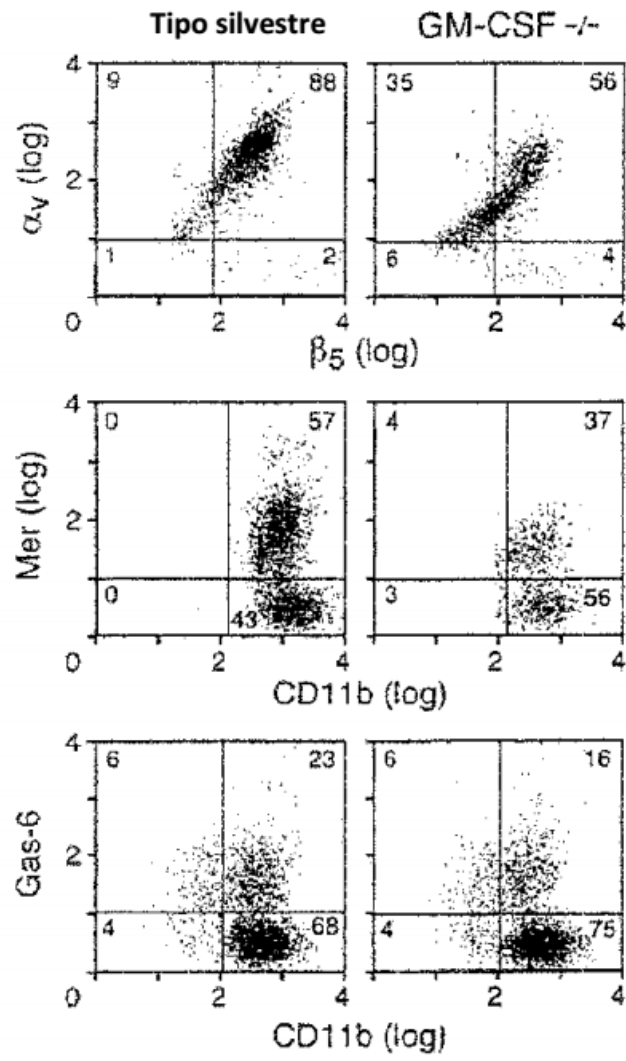


Figura 8

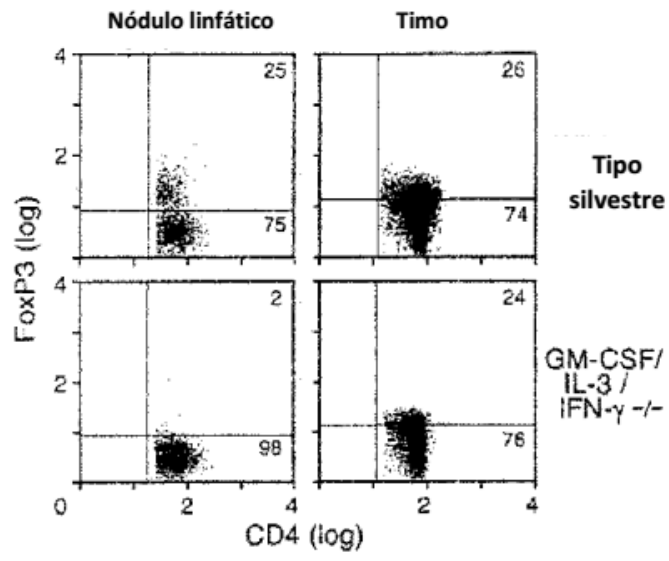


Figura 9

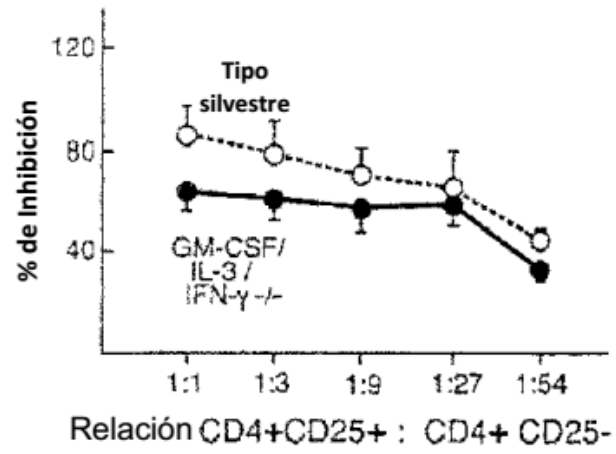


Figura 10

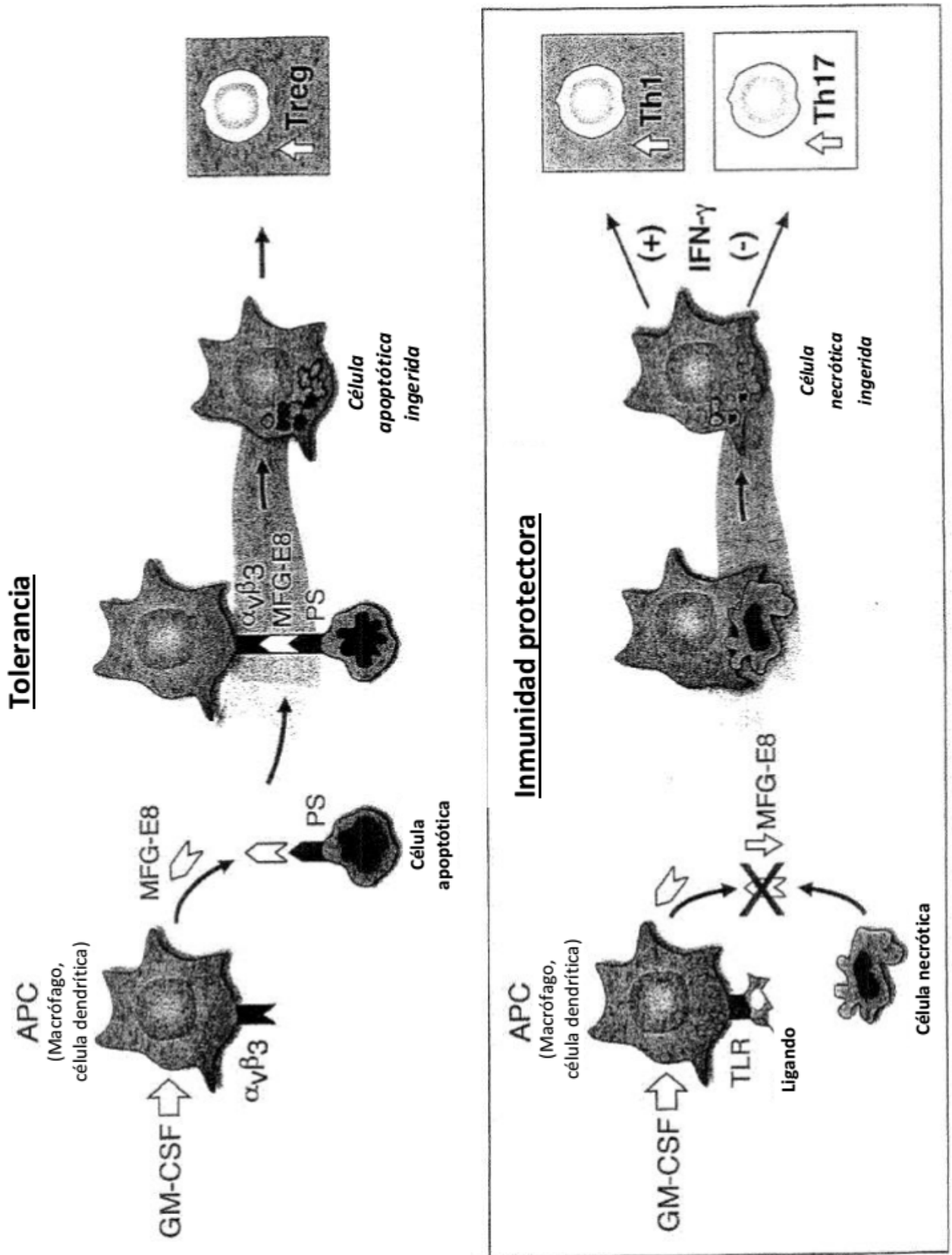


Figura 11

```

      10      20      30      40      50
MPRPRLAAL CGALLCAPSL LVALDICKSN PCHNGGLCEE ISQEVRGDVDVF
      60      70      80      90      100
PSYTCTCLKG YAGNHCETKC VEPLGMENGN IANSQIAASS VRVTFEGFFLGLQH
      110     120     130     140     150
WVPELARLNR AGMVNAWTPS SNDDNPWIQV NLLRRMWVTG VVTQGASRLA
      160     170     180     190     200
SHEYLKAFKV AYSLNGHEFD FIHDVNKKHK EFVGNWKNNA VHVNLC1FETPV
      210     220     230     240     250
EAQYVRLYPT SHTACTLRF ELLGCELNGC ANPLGLKNNS IPDKQITASS
      260     270     280     290     300
SYKTWGLHLF SWNPSYARLD KQGNFNAWVA GSYGNDQWLQ VDLGSSKEVT
      310     320     330     340     350
GIITQGARNF GSVQFVASYK VAYSNDSANW TEYQDPRTGS SKIFFGNWDN
      360     370     380     387
HSHKKNLFET PILARYVRIL PVAWHNRIAL RLELLGC

```

El motivo RGD se muestra en negrita en los aminoácidos 46-48.

El dominio EGF está subrayado y se extiende del aminoácido 21 al 66.

El dominio C1 se muestra en negrita y se extiende del aminoácido 61 al 125.

El dominio C2 se muestra en negrita y se extiende del aminoácido 230 al 387.

Figura 12

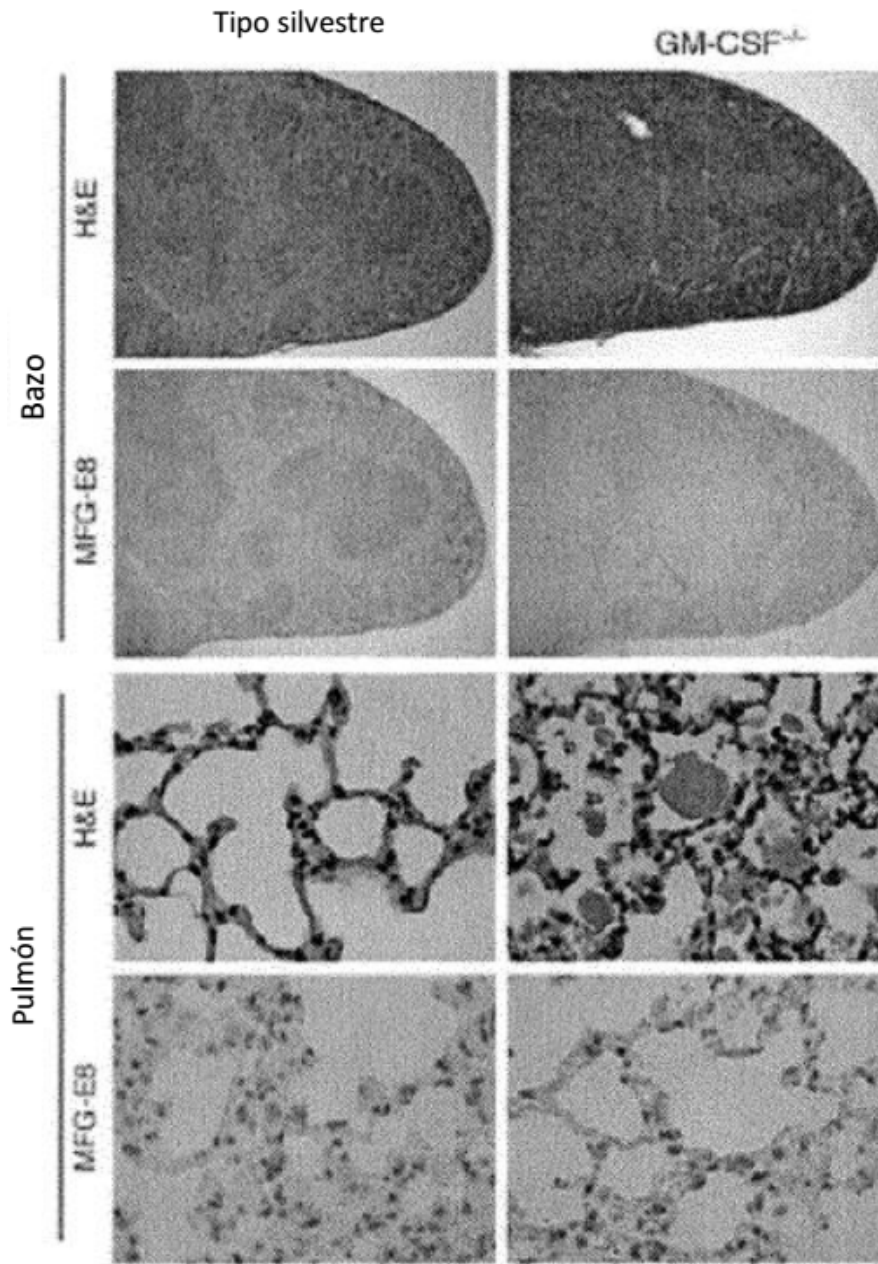


Figura 13

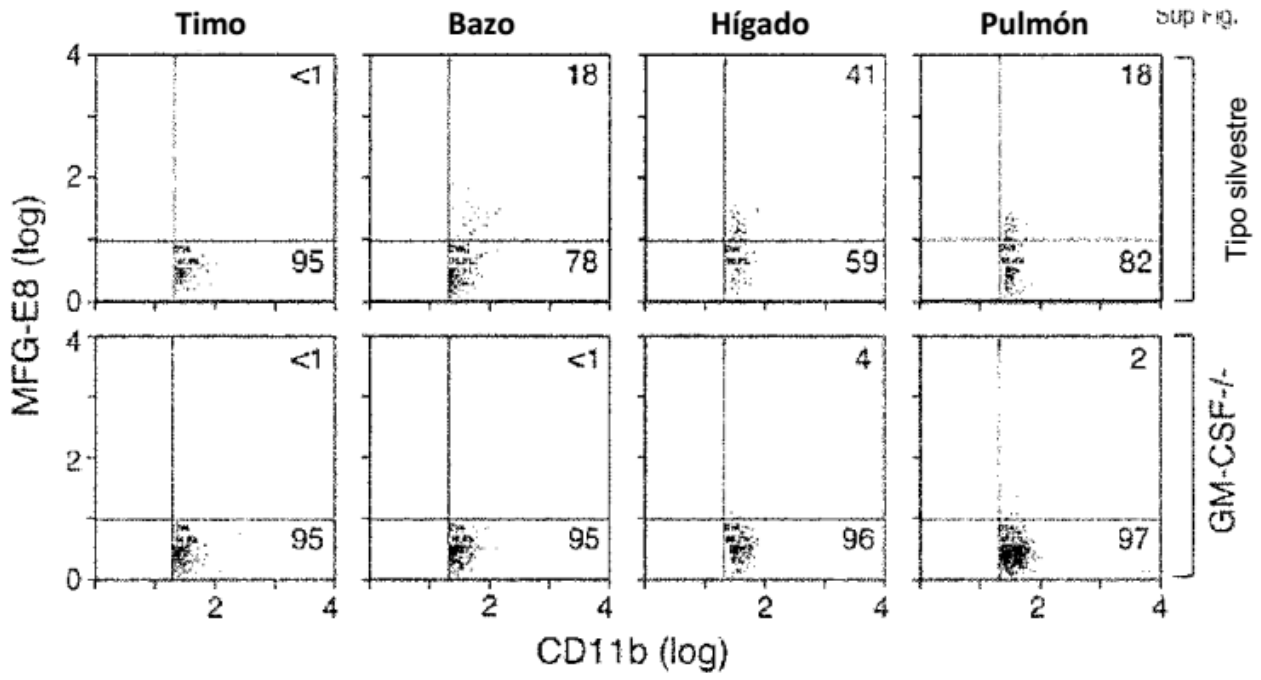


Figura 14

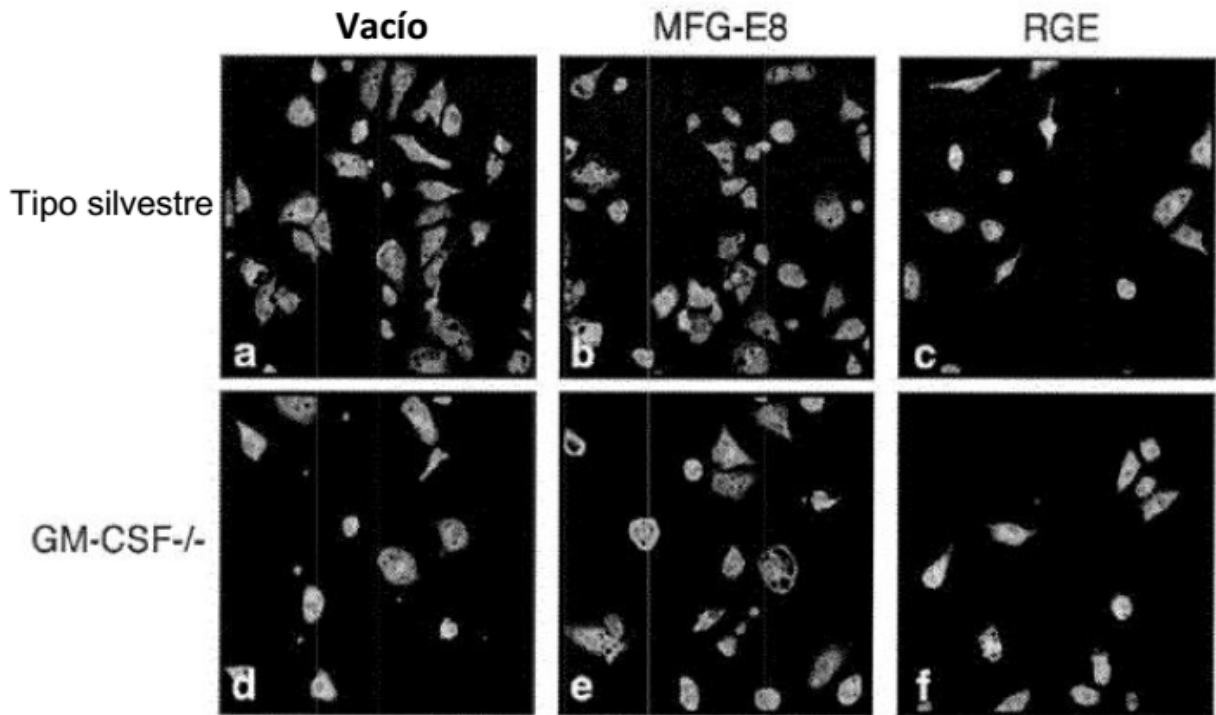


Figura 15

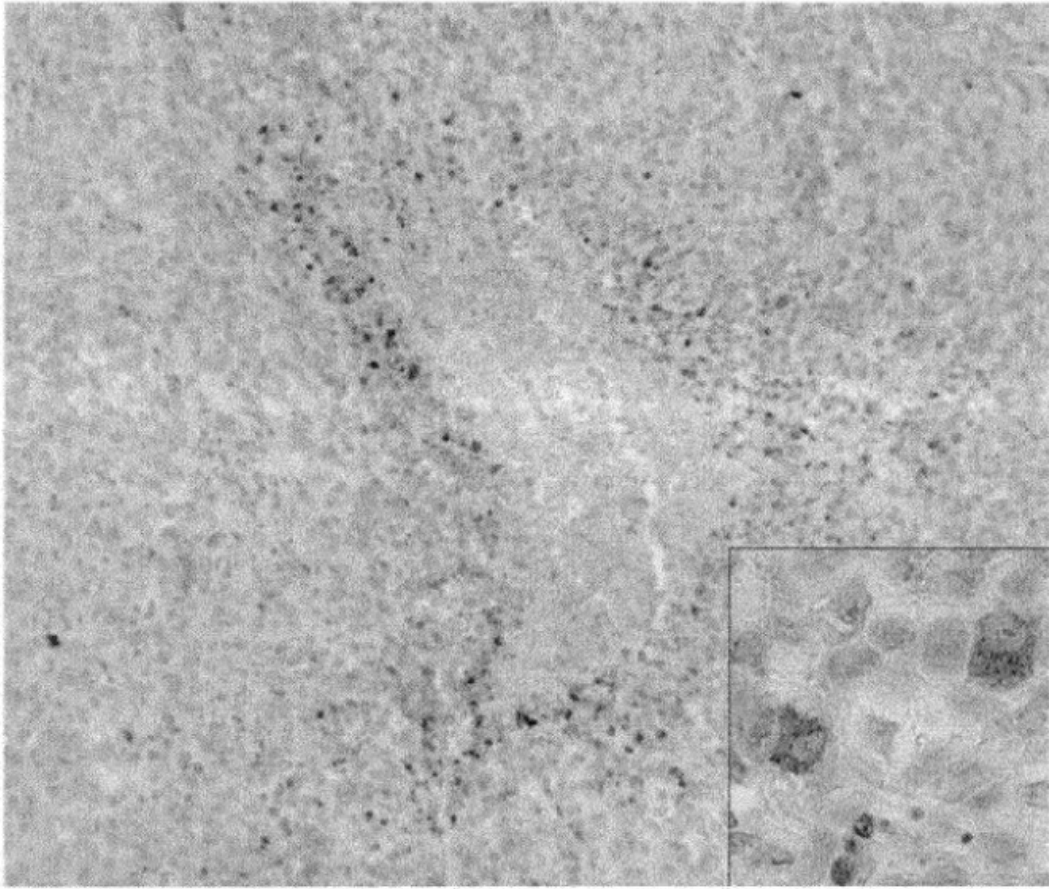


Figura 16