(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 666 185**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/17	(2006.01)
A61K 38/20	(2006.01)
A61K 31/58	(2006.01)
A61K 35/15	(2015.01)
C12Q 1/68	(2008.01)
C12N 15/113	(2010.01)
C12N 15/115	(2010.01)
A61K 39/00	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2010** **PCT/FI2010/050266**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.10.2010** **WO10122217**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2010** **E 10766694 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018** **EP 2421888**

(54) Título: **Antagonistas del receptor CLEVER-1 para bloquear los macrófagos inmuno-inhibidores de tipo 2**

(30) Prioridad:

22.04.2009 FI 20090161

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.05.2018

(73) Titular/es:

FARON PHARMACEUTICALS OY (100.0%)
Joukahaisenkatu 6
20520 Turku, FI

(72) Inventor/es:

JALKANEN, SIRPA;
SALMI, MARKO y
JALKANEN, MARKKU

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 666 185 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

Antagonistas del receptor CLEVER-1 para bloquear los macrófagos inmuno-inhibidores de tipo 2

Campo de la invención

La invención hace referencia a un agente capaz de modular un receptor Clever-1 de la superficie de la célula macrófago de tipo 2 que, además del receptor de manosa, también expresa al receptor Clever-1 para ser usado en el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

CLEVER-1 (del inglés *Common Lymphatic Endothelial and Vascular Endothelial Receptor-1*) es una proteína descrita en la solicitud de patente internacional WO 3/057130, que significa receptor 1 común del endotelio linfático y del endotelio vascular. Es una proteína de fijación que interviene en la adhesión de los linfocitos (y de las células tumorales malignas) al endotelio en los vasos sanguíneos y en los vasos linfáticos. Al bloquear la interacción de Clever-1 y su sustrato linfocitario, es posible controlar simultáneamente la recirculación de los linfocitos y la migración de los linfocitos, y las afecciones relacionadas, tales como inflamación, en el sitio de entrada, y de salida, de los linfocitos en los tejidos. La solicitud de patente internacional WO 03/057130 también describe que Clever-1 interviene en la fijación de otros tipos de leucocitos, tales como los monocitos y los granulocitos, a los vasos de tipo VEA. Así pues, al bloquear la interacción de Clever-1 y de las células tumorales malignas, se hizo posible controlar la metástasis al impedir que las células malignas que se fijan a Clever-1 sean tomadas por los vasos linfáticos y, así pues, se impide la diseminación de la neoplasia hacia los ganglios linfáticos.

Clever-1 se expresa en las células del endotelio linfático, en determinadas células del endotelio vascular, pero también en una subpoblación de macrófagos. En los macrófagos, Clever-1 se sabe que funciona como un receptor de depuración, que puede intervenir en la captación endocítica de diferentes moléculas, tales como las LDL oxidadas.

Los macrófagos se dividen tradicionalmente entre células de tipo 1 y de tipo 2. Los macrófagos de tipo 1 son los macrófagos proinflamatorios clásicos, que producen una gran cantidad de citocinas pro inflamatorias y moléculas coestimuladoras, y son muy eficaces a la hora de activar las respuestas de los linfocitos T. Los macrófagos de tipo 2, en cambio, son células inmunitarias supresoras, que sintetizan citocinas antiinflamatorias e inducen los linfocitos T reguladores y, por lo tanto, amortiguan profundamente la activación de los linfocitos T impulsada por el antígeno. Los macrófagos asociados a los tumores se consideran perjudiciales, ya que se maduran en macrófagos de tipo 2 dentro del entorno tumoral y suprimen la respuesta inmunitaria antitumoral (Martinez, F. O. et al. «Macrophage activation and polarization». *Front. Biosci.* 13: 453-461) e intervienen en el cambio angiogénico, una etapa crucial del crecimiento del cáncer (Lin, E. Y. y Pollard, J. W. 2007. «Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer». *Cancer Res.* 67: 5064-5066). Los macrófagos de tipo 2 y su función también se ha debatido en la publicación Kzhyshkowska J, *Aktuelle Dermatologie* 200803 DE, vol. 34, n.º 3 (marzo de 2008), págs. 72-74.

El informe de búsqueda de la presente solicitud también hace referencia a las propias notas de prensa del solicitante con fecha de 23 de marzo de 2005 y de 1 de enero de 2005.

Compendio de la invención

Acabamos de identificar un nuevo subtipo de macrófagos en los tumores. Esta nueva célula se puede definir como una célula de macrófago de tipo 2 que también expresa un receptor Clever-1. Hemos denominado a esta célula «macrófago de tipo 3». Este nuevo «macrófago de tipo 3» es, al igual que los macrófagos de tipo 2, una célula inmunitaria supresora. Al modular (contrarrestar o estimular, respectivamente) el receptor Clever-1 en esta nueva célula, hemos hallado sorprendentemente que se trata de un método que afecta al sistema inmunitario de un individuo. Al contrarrestar o reprimir el receptor, se reduce el tamaño del tumor maligno.

Así pues, se ha hallado una célula aislada (macrófago de tipo 3) que es una célula de macrófago de tipo 2 que comprende un receptor Clever-1, en donde dicha célula procede del tumor de un individuo.

Un método para afectar al sistema inmunitario de un individuo y para el tratamiento de las enfermedades o afecciones relacionadas con el funcionamiento del sistema inmunitario, en donde dicho método comprende la modulación del receptor Clever-1 de la nueva célula (a saber, el «macrófago de tipo 3») en dicho individuo.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1A. El tratamiento con anti-Clever-1 es eficaz en el melanoma. Las células de melanoma B16-luc fueron inyectadas por vía subcutánea en la oreja. El crecimiento del tumor primario y el desarrollo de las metástasis fue seguido mediante el sistema de detección de quimioluminiscencia IVIS. (A) Tamaño relativo (media ± EEM) del tumor primario después de 10 y 14 días en los dos grupos de tratamiento. (B) Tamaño relativo (media ± EEM) de las metástasis al final del experimento (día 14). El tamaño del tumor primario y de las metástasis en el grupo tratado

como control es 1,0 por definición. (C) Ejemplos de animales tratados con el anticuerpo anti-Clever-1 o el de control. Las flechas blancas señalan el lugar de la inyección (tumor primario) y las flechas amarillas señalan las metástasis en el cuello. Obsérvese que un ratón tratado con el anticuerpo anti-Clever-1 no tiene ningún tumor detectable en el lugar de la inyección, y que el otro no tiene metástasis en el cuello. *N* = 12 en ambos grupos.

Figura 1B. En la figura se muestra el desarrollo del tumor primario (A) y de las metástasis (B) cuando el tratamiento con el anticuerpo se comenzó tres días después de la inyección de las células de melanoma B16 (día 14, *n* = 12 en ambos grupos, y día 20, *n* = 6 en ambos grupos).

Figura 2. El tratamiento con anti-Clever-1 reduce el número de macrófagos de tipo 2 y de linfocitos T reguladores en los tumores, pero no afecta a la vasculatura. (A) Número de linfocitos T reguladores. (B) Número de macrófagos de tipo 2. (C) Número de linfocitos T positivos para CD3. (D) Número de linfocitos T positivos para CD8. (E) Número de vasos positivos para CD31 y ejemplos de la tinción de inmunofluorescencia de tumores primarios y metástasis con el anticuerpo anti-CD31 de ratones tratados con el anticuerpo de control y tratados con anti-Clever-1. (F) Número de vasos positivos para PV-1 detectados con el anticuerpo anti-MECA-32 y ejemplos de tinción de inmunofluorescencia de tumores primarios y metástasis con el anticuerpo anti-MECA-32 de ratones tratados con el anticuerpo de control y tratados con anti-Clever-1. CGA: campo de gran aumento. Barra: 100 µm.

Figura 3. Los macrófagos de tipo 2 asociados a tumores expresan Clever-1, pero están ausentes en los ganglios linfáticos después de la inmunización. (A) Tinción con inmunofluorescencia de las metástasis del melanoma en los ratones tratados con el control y con anti-Clever-1. Tinción doble con anti-MR (verde) y anti-Clever-1 (rojo). (B) Tinciones inmunohistoquímicas de macrófagos en los ganglios linfáticos poplíteos después de la inmunización con OVA. En verde se tiñe el MR, en rojo se tiñe el Clever-1. (C) Tinción del endotelio linfático de los mismos ganglios linfáticos poplíteos después de la inmunización con OVA. En verde se tiñe el MR, en rojo se tiñe el Clever-1. Barras de (A) y (B), 50 µm, (C) 100 µm.

Figura 4. El tratamiento con anti-Clever-1 no deterioró significativamente la respuesta de anticuerpos. Los conejos se inmunizaron con SAB, con *Salmonella enteritidis* inactivada por calor y con LPS de *E. coli,* y se trataron con el anticuerpo anti-Clever-1 o bien con el de control. La titulación de los anticuerpos se midió por ELISA los días 7 y 11 después de la inmunización primaria. La línea discontinua indica la titulación en los animales sin inmunizar (que reciben el anticuerpo).

Figura 5. Los ratones tratados con anti-Clever-1 responden con normalidad a la inmunización con OVA. (A) Número de linfocitos en los órganos indicados. (B) Porcentaje de linfocitos B, y de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$. (C) Porcentaje de linfocitos T reguladores. (D) Respuesta de la proliferación y titulación del anticuerpo contra OVA.

Figura 6. La expresión de Clever-1/Estabilina-1 está inducida en la vasculatura tumoral del melanoma, en donde se fija a los leucocitos infiltrados en el tumor y a los linfocitos $CD4^+$ de la sangre periférica. (A) Tinción con dos colores de Clever-1/Estabilina-1 con el anticuerpo 1.26 biotinilado (rojo, izquierda) y PV-1 con el anticuerpo MECA-32 (verde, en medio) que identifica los vasos tumorales. A la derecha se muestra la superposición de las tinciones con 1.26 y MECA-32. Los vasos se señalan mediante flechas delgadas y un macrófago de tipo 2 (positivo para Clever-1/Estabilina-1, rojo) está señalado mediante una flecha gruesa. Barra: 100 µm. (B) La positividad vascular se confirmó con otro anticuerpo monoclonal (9-11) contra Clever-1/Estabilina-1 (fragmento de 3 kb del extremo amino). La tinción con un anticuerpo de control negativo se muestra en el inserto. (C) Clever-1/Estabilina-1 sobre la vasculatura interviene en la fijación de los leucocitos infiltrados en el tumor. La fijación de los leucocitos infiltrados en el tumor (LIT) grandes y pequeños, así como de linfocitos $CD4^+$ de la sangre a los vasos en los melanomas obtenidos de los ratones tratados *in vivo* con anti-Clever-1/Estabilina-1 (*n* = 3) o el anticuerpo de control (*n* = 3) se analizó con ensayos de cortes congelados *ex vivo*. Los resultados se presentan como la media % ± EEM de la fijación obtenida de los melanomas de ratones tratados con el anticuerpo de control (por definición el 100%).

Descripción detallada de la invención

Definiciones y realizaciones preferidas:

El término «CLEVER-1» se utiliza para designar la proteína descrita en la solicitud de patente internacional WO 03/057130, el receptor-1 común del endotelio linfático y del endotelio vascular (*Common Lymphatic Endothelial and Vascular Endothelial Receptor-1*), una proteína de fijación que interviene en la adhesión de los linfocitos (y de las células tumorales malignas) al endotelio tanto de los vasos sanguíneos como de los vasos linfáticos. La secuencia de nucleótidos (7879 nt) y la secuencia de aminoácidos de Clever-1 se muestra en la SEQ ID n.º 1. En la secuencia de nucleótidos de Clever-1 hay cuatro nucleótidos diferentes cuando con respecto a la entrada de Genebank AJ2752213 (Estabilina-1), a saber, los nucleótidos 1131, 2767, 6629 y 6969.

El término «macrófago de tipo 2» se deberá entender como un macrófago supresor inmunitario que expresa un receptor de manosa.

El término «macrófago de tipo 3» se deberá entender como una subpoblación de macrófagos de tipo 2 que, además del receptor de manosa, también expresa el receptor Clever-1. El receptor Clever-1 sobre la célula macrófago de

tipo 3 puede ser la secuencia completa (SEQ ID n.º 1), una leve modificación de la misma (tal como la Estabilina-1), o un fragmento de la misma.

El término «tratamiento» o «tratar» se deberá entender que incluye la curación completa de una enfermedad o un trastorno, así como la mejoría o el alivio de dicha enfermedad o trastorno.

El término «prevención» se deberá entender que incluye la completa prevención, profilaxis, así como la disminución del riesgo del individuo de enfermar con dicha enfermedad o trastorno.

El término «individuo» hace referencia a un sujeto humano o animal.

El término «cantidad eficaz» pretende incluir cualquier cantidad de un agente de acuerdo con la presente invención que es suficiente para obtener un resultado terapéutico deseado, en particular tras la administración a un sujeto animal o humano.

El término «inhibir» o «inhibición» se deberá entender que incluye no solo la inhibición completa, sino también cualquier grado de supresión.

El método para afectar al sistema inmunitario de un individuo mediante la modulación del receptor Clever-1 sobre la célula de macrófago de tipo 3 se puede utilizar para reducir el tamaño del crecimiento del tumor maligno en un individuo. En esta realización, se administra al individuo una cantidad eficaz de un agente capaz de contrarrestar la influencia, o de reprimir la expresión, de la proteína Clever-1.

Agentes preferidos

La terminología «un agente capaz de contrarrestar la influencia de Clever-1» se deberá entender que incluye péptidos o proteínas (tales como Clever-1 soluble o anticuerpos antagonistas de Clever-1) que bloquean la proteína Clever-1, así como cualquier inhibidor, en particular moléculas pequeñas inhibidoras, útiles para inhibir la actividad de la proteína. Los agentes particularmente útiles son los anticuerpos.

La terminología «un agente capaz de reprimir la expresión de Clever-1» se deberá entender que incluye oligonucleótidos antisentido, ARN pequeños interferentes (siRNA, por su nombre en inglés), así como ribozimas, o vectores capaces de ser capaces de expresarlos, o partes esenciales de los mismos, *in vivo*.

El término «anticuerpo» se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales únicos (que incluyen anticuerpos agonistas y antagonistas), anticuerpos policlonales así como fragmentos de anticuerpos y anticuerpos monocatenarios (p. ej., Fab, $F(ab')_2$, Fv), siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada. La digestión de los anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de fijación al antígeno idénticos, denominados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de fijación al antígeno, y un fragmento «Fc» residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse con facilidad. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y sigue siendo capaz de entrecruzarse con el antígeno. El «Fv» monocatenario es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y fijación del antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada en asociación no covalente estrecha. Es en esta configuración cuando las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de fijación del antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. En conjunto, las seis CDR confieren especificidad de fijación del antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y fijarse al antígeno, aunque con una afinidad más baja que el sitio de fijación completo. Véase, Ladner et al., patente de los EE .UU. n.º 4.946.778 y Bird, R. E. et al., *Science*, 242: 423-426 (1988).

El término «anticuerpo» se deberá entender que incluye también a los anticuerpos (con CDR injertadas) quiméricos, humanizados o primatizados, así como a los anticuerpos monocatenarios quiméricos o con CDR injertadas, y similares, que comprenden porciones procedentes de diferentes especies. Los anticuerpos «quiméricos» (inmunoglobulinas) tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera que es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos procedentes de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase concreta de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas a las correspondientes secuencias de los anticuerpos procedentes de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Cabilly et al., patente de los EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984). Las diferentes porciones de estos anticuerpos se pueden juntar químicamente mediante técnicas convencionales, o se pueden preparar como una proteína contigua con técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican una cadena quimérica o humanizada se pueden expresar para producir una proteína contigua. Véase, p. ej., Cabilly et al., patente de los EE. UU. n.º 4.816.567. Véase también Newman, R. et al., *BioTechnology* 10: 1455-1460 (1992), con respecto al anticuerpo primatizado.

Los anticuerpos antagonistas de Clever-1 particularmente preferidos son los anticuerpos monoclonales 3-266 (DSM ACC2519) y 3-372 (DSM ACC2520), ambos depositados bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el

Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos del Procedimiento en Materia de Patentes el 21 de agosto de 2001, con DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig. Véase la solicitud de patente internacional WO 03/057130.

Para el tratamiento de individuos humanos, se prefieren las variantes humanizadas o quiméricas o primatizadas de los anticuerpos monoclonales mencionados más arriba.

Los inhibidores preferibles son las moléculas pequeñas inhibidoras.

Preferiblemente, el agente capaz de hacer descender la expresión de Clever-1 es un ARN pequeño interferente (siRNA) o un vector de expresión que comprende el ácido nucleico que codifica el dúplex del siRNA o la hebra antisentido del dúplex de una manera que permite la expresión del dúplex de siRNA o de la hebra antisentido dentro de una célula de mamífero. Tales dúplex de siRNA para otra proteína, VAP-1, están descritos en la solicitud de patente internacional 2006/134203.

El principio de los siRNA está abundantemente explicado en la bibliografía. Como ejemplos se pueden mencionar las publicaciones de patente de los EE. UU. 2003/0143732, 2003/0148507, 2003/0175950, 2003/0190635, 2004/0019001, 2005/0008617 y 2005/0043266. Una molécula de dúplex de siRNA comprende una región antisentido y una hebra sentido, en donde dicha hebra antisentido comprende la secuencia complementaria a una región diana en una secuencia de ARNm que codifica una determinada proteína, y la hebra sentido comprende la secuencia complementaria a dicha hebra antisentido. Así pues, la molécula del dúplex de siRNA se ensambla a partir de dos fragmentos de ácido nucleico, en donde un fragmento comprende la hebra antisentido y el segundo fragmento comprende la hebra sentido de dicha molécula de siRNA. La hebra sentido y la hebra antisentido pueden estar conectadas covalentemente a través de una molécula conectora, que puede ser un conector polinucleotídico o un conector no nucleotídico. La longitud de las hebras antisentido y sentido son típicamente de aproximadamente 19 a 21 nucleótidos cada una. Típicamente, la hebra antisentido y la hebra sentido comprenden ambas una protuberancia en el extremo en 3' de unos pocos nucleótidos, típicamente 2. El extremo en 5' de la hebra antisentido es típicamente un grupo fosfato (P). Los dúplex de siRNA que tienen grupos fosfato (P) terminales son más fáciles de administrar a la célula que una hebra antisentido monocatenaria. En la célula, se forma una hebra antisentido activa de siRNA y reconoce una región diana del ARNm destinatario. Esto a su vez conduce a la escisión del ARN destinatario mediante la endonucleasa del complejo RISC (del inglés *RNA-induced silencing complex:* complejo silenciador inducido por ARN) y también en la síntesis de un ARN adicional mediante la ARN polimerasa dependiente del ARN (RdRP, por su nombre en inglés), que puede activar a DICER y dar lugar a más moléculas del dúplex de siRNA, con lo que se amplifica la respuesta.

El término «complementario» significa que la secuencia de nucleótidos puede formar puentes de hidrógeno con la secuencia de ARN destinataria mediante interacciones entre bases de pares de Watson-Crick o de otro tipo. El término se debe entender que cubre también las secuencias que no son complementarias al 100%. Se cree que también debe funcionar con una complementariedad más baja. Sin embargo, se prefiere una complementariedad del 100%.

El siRNA deberá, cuando se utiliza como una sustancia farmacéutica, introducirse en una célula deseada. La introducción se puede conseguir de dos modos principales y diferentes: 1) administración exógena del oligonucleótido, o 2) transcripción endógena de una secuencia de ADN que codifica el oligonucleótido, en donde la secuencia del ADN está localizada en un vector.

El ARN normal sin modificar es poco estable en las condiciones fisiológicas debido a su degradación por las enzimas ribonucleásicas presentes en la célula viva. Si el oligonucleótido se debe administrar por vía exógena, es muy deseable que se modifique la molécula de acuerdo con los métodos conocidos para mejorar su estabilidad contra la degradación química y enzimática.

Las modificaciones de los nucleótidos a administrar por vía exógena *in vivo* están extensamente descritas en la técnica. Principalmente, se puede modificar cualquier parte del nucleótido, a saber, el azúcar ribosa, la base y/o las hebras de fosfodiésteres internucleotídicos.

Se debe recalcar que las modificaciones mencionadas más arriba son sólo ejemplos no limitantes.

Una región diana útil se puede identificar con facilidad al utilizar cualquiera de los numerosos algoritmos académicos o adquiribles comercialmente que se han desarrollado para ayudar a los científicos a localizar las secuencias de siRNA utilizables. Como ejemplos de tales sistemas de programas informáticos se pueden mencionar siDirect (http://design.RNAi.jp/) (*Nucleic Acids Res*. 1 de julio de 2004; 32: W124-9); TROD (T7 RNAi Oligo Designer (http://www.cellbio.unige.ch/RNAi.html; *Nucleic Acids Res*., 1 de julio de 2004; 32 : W121-3); DEQOR (http://cluster-1.mpi-cbg.de/Deqor/deqor.html; *Nucleic Acid Res*., 1 de julio de 2004; 32: W113-20) o los programas disponibles en http://genscript.com; http://www.genscript.com/rnai.html#design o http://www.genscript.com/sirna_ca.html#design; Bioinformatics, 22 de julio de 2004; 20 (11) 1818-20. Un criterio esencial de las herramientas es conseguir que los siRNA tengan la máxima especificidad de diana para la interferencia por ARN en los mamíferos, donde se evita el silenciamiento génico inespecífico. La utilidad de cualquier secuencia identificada con tales algoritmos se debe

verificar después con experimentos.

Los agentes para estimular la proteína Clever-1 son, por ejemplo, anticuerpos agonistas y moléculas pequeñas agonistas. Con «anticuerpo agonista» se hace mención a un anticuerpo que es capaz de fijarse a Clever-1 y de facilitar la adhesión de otro tejido.

Las moléculas pequeñas agonistas preferidas son agentes supresores inmunitarios, tales como agentes antiinflamatorios, en particular las interleucinas, tales como la interleucina 4, la interleucina 13 o las hormonas esteroideas, tales como dexametasona, o una combinación de las mismas.

Enfermedades que responden al tratamiento

El método para tratar o prevenir el cáncer mediante la reducción del tamaño del tumor maligno de acuerdo con esta invención es aplicable a todas las formas de cánceres. Así pues, se puede tratar cualquier tumor maligno o benigno o metástasis de tumor maligno, tal como el cáncer de piel y el cáncer de colon. También se pueden tratar las leucemias, linfomas y mielomas múltiples. En concreto, los melanomas y los linfomas responden muy bien al tratamiento.

Creemos que la invención es útil para el tratamiento o la prevención de toda clase de sarcomas, por ejemplo, fibrosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma, angiosarcoma, linfangiosarcoma, leiomiosarcoma y rabdomiosarcoma, mesotelioma, meningioma, leucemias, linfomas, así como toda clase de carcinomas, tales como los carcinomas de células epidermoides, carcinoma de células basales, adenocarcinomas, carcinomas papilares, cristadenocarcinomas, carcinomas broncogénicos, melanomas, carcinomas de células renales, carcinoma hepatocelular, carcinomas de las células de transición, coriocarcinomas, seminomas y carcinomas embrionarios.

Vías de administración, formulaciones y dosis necesaria

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por cualquier medio que consiga el propósito para el que se diseñaron. Por ejemplo, la administración puede ser parenteral, subcutánea, intravenosa, intraarticular, intratecal, intramuscular, intraperitoneal o inyecciones intradérmicas, o mediante las vías transdérmica, yugal, ocular o por inhalación. Como alternativa, la administración puede ser por vía oral. Particularmente preferida para las moléculas pequeñas inhibidoras podría ser la administración oral. Además de los compuestos farmacológicamente activos, las preparaciones farmacéuticas de los compuestos contienen preferiblemente vehículos farmacéuticamente aceptables e idóneos que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en las preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente.

Para reducir el tamaño del tumor maligno y/o al reducir el crecimiento del tumor maligno, la administración intratumoral podría ser útil.

El dúplex de siRNA se puede administrar al individuo mediante diferentes métodos. De acuerdo con un método, el siRNA se podría administrar de manera exógena como tal, o en forma de una composición farmacéutica mezclada con un vehículo idóneo, que puede ser, por ejemplo, un liposoma, colesterol, ácido litocólico, ácido láurico, un lípido catiónico, polietilenimina (PEI) o sus conjugados con sus derivados de polietilenglicol (PEG). Sin embargo, también se pueden utilizar otros vehículos.

El siRNA se puede administrar de manera sistémica o local. Como vías idóneas de administración se pueden mencionar la administración intravenosa, intramuscular, inyección subcutánea, inhalación, oral, tópica, ocular, sublingual, nasal, rectal, intraperitoneal, y los sistemas de administración transdérmica. La composición que contiene el siRNA puede, en vez de utilizar la inyección directa, administrarse también mediante el uso de, por ejemplo, un catéter, bomba de infusión o derivación.

Otro método para conseguir concentraciones altas del siRNA en las células es incorporar la secuencia que codifica el siRNA en un vector de expresión y administrar tal vector al individuo. En esta aplicación, el vector de expresión se podía construir de tal manera que se expresa el dúplex del siRNA o bien sólo la hebra antisentido del mismo, p. ej., en forma de ARN ahorquillado pequeño. El vector de expresión puede ser una secuencia de ADN, tal como un plásmido de ADN, capaz de llevar a cabo la expresión eucariota, o un vector vírico. Tal vector vírico se basa preferiblemente en un adenovirus, un alfavirus, un dependovirus o un retrovirus. Preferiblemente, el vector se introduce en el paciente de una manera similar a como se hace con el siRNA descrito más arriba. La introducción del vector de expresión puede ser sistémica, tal como la administración intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, o la administración local al tejido deseado o a las células explantadas del paciente, seguido de su reintroducción en el paciente. Ya que la administración intravenosa del siRNA actúa preferiblemente de forma selectiva sobre la vasculatura del hígado (Lewis D. L. y Wolf J. A., *Methods Enzymol.* 2005; 392: 336-50; Soutschek J. et al., *Nature.* 11 de noviembre de 2004; 432 (7014): 173-8; y Song E. et al., *Nat. Med.* marzo de 2003; 9(3): 347-51), las enfermedades del hígado son dianas especialmente idóneas para la intervención. Se ha descrito que los siRNA, en particular los incluidos en liposomas, son muy útiles para actuar selectivamente sobre el tejido hepático. No se han descrito efectos secundarios tóxicos.

Así pues, una dosis típica está en el margen de dosificación de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, preferiblemente entre 1,0 µg/kg y 10 mg/kg de masa corporal. Los compuestos para ser usados en la presente invención se podrían administrar en una única dosis diaria, o la dosis diaria total se podría administrar en dosis fraccionadas de dos, tres o cuatro veces al día. Cuando se utiliza el siRNA, una dosis diaria típica está en el margen de dosificación de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 5 mg/kg de masa corporal. Se cree que la frecuencia de administración idónea es de 1 a 2 dosis al día. Cuando el RNAi se administra mediante un vector de expresión, se cree que es suficiente una única dosis (o dosis únicas repetidas a determinados intervalos, p. ej., una vez a la semana).

Métodos diagnósticos:

El método para la detección o cuantificación de Clever-1 se podría basar en la detección o cuantificación de la cantidad de proteína Clever-1 en un tejido o líquido corporal al

i) determinar la expresión del ARNm de Clever-1 en dicho tejido o líquido corporal por RT-PCR o por una técnica de hibridación, o

ii) someter el tejido o líquido corporal que se espera que contenga la proteína Clever-1 a un aglutinante (tal como un anticuerpo, aficuerpo o aptámero) que reconoce dicha Clever-1, y la detección y/o cuantificación de dicho aglutinante, o someter dicho tejido o líquido corporal al análisis mediante técnicas proteómicas.

La técnica de hibridación incluye, por ejemplo, la hibridación del ADN y la transferencia de tipo Northern. La detección o la cuantificación del anticuerpo u otro aglutinante se puede llevar a cabo de acuerdo con los protocolos estándares de inmunoensayo, tales como los ensayos inmunosorbentes de unión a la marcación, transferencia de tipo Western y los métodos inmunohistoquímicos.

La invención se ilustrará mediante el apartado experimental no restrictivo que viene a continuación.

Apartado experimental

Material y métodos

Animales. Se utilizaron ratones Balb/C y C57B16 (de 6 a 9 semanas de edad) y conejos blancos de Nueva Zelanda (NZW) en los experimentos *in vivo*. El Comité Local de Ética autorizó los procedimientos experimentales que se utilizaron en este estudio.

Líneas celulares tumorales. KCA, una línea de células linfoblastoides de humano, fue una generosa donación de E. Engleman (Universidad de Stanford, CA). La línea de células de melanoma B16-F10-luc-G5 que contiene una construcción de la luciferasa se compró a Xenogen (Alameda, CA). Las células tumorales se cultivaron en RPMI 1640 (KCA) y MEM/HBSS (melanoma B16) (Hyclone, Logan, Utah) complementado con SBF al 10% (Invitrogen, Gibco), aminoácidos no esenciales (Biological Industries, Haemek, Israel), L-glutamina a 200 mM (B10 Whittaker, Walkersville, MD), piruvato de sodio a 1 mM (Invitrogen, Gibco) y una solución de vitaminas MEM (Invitrogen, Gibco, Paisley, GB).

Migración de las células tumorales a través de los vasos linfáticos en los conejos. A los conejos se les dio el anticuerpo 3-372 (anti-Clever-1, n = 8) o el de control (n = 9) a 2 mg/kg por vía i.v. un día antes y el mismo día que la transferencia de las células de linfoma. Además, se añadieron 0,5 mg de anticuerpos a la suspensión de células de linfoma KCA marcadas con CFSE que se dio por vía subcutánea en las almohadillas plantares. Después de 24 horas de la transferencia celular, se recogieron los ganglios linfáticos poplíteos y las suspensiones celulares se analizaron por citometría de flujo.

Modelo de metástasis linfática. Las células de melanoma B16-F10-luc-G5 a una dosis de 400.000 células en 30 µl de RPMI 1640 (GIBCO) se inyectaron por vía subcutánea en la oreja izquierda del ratón. Los tumores inoculados se pueden observar como nódulos negros a través de la piel. El crecimiento tumoral se midió mediante la bioluminiscencia de la luciferasa (Marttila-Ichilara, F., et al., *Blood* 112: 64-72) dos veces a la semana. Brevemente, los ratones se anestesiaron con isoflurano al 2,5% (Becton Dickinson). Se inyectaron por vía intraperitoneal 150 mg/kg del sustrato sal sódica de D-luciferina (Synchem, Kassel, Alemania) a los ratones 10 min antes de la toma de imágenes. Se tomó una imagen fotográfica en blanco y negro en la cámara oscura con una cámara CCD enfriada (–70 °C) (IVIS; Xenogen, Alameda, CA). Se cuantificó la intensidad de la señal como el número de fotones con el programa informático Living Image (Xenogen). Un día antes de la inyección del tumor, se trataron doce ratones C57B1/6J con el anticuerpo anti-Clever-1 (Schledzewski, K. et al., *J. Pathol.*, 209: 67-77) y el mismo número de ratones se trató con el anticuerpo de control NS-1 con inyección subcutánea de los anticuerpos a una dosis de 50 µg en la oreja. La administración intraperitoneal del anticuerpo a una dosis de 100 µg se comenzó un día después de la inyección del tumor y a continuación se repitió cada tres días. Los ratones se sacrificaron el día 14.

Inmunohistoquímica. Los cortes congelados y fijados en acetona de la oreja y de las metástasis de los ganglios linfáticos periféricos de los ratones se tiñeron con el Acm de rata contra el receptor de manosa de los macrófagos

(MR, MR5D3, un marcador para los macrófagos de tipo 2, una generosa donación de L. Martínez-Pomares), contra el antígeno PV-1 (antígeno de los vasos sanguíneos, MECA-32, generosa donación de E. Butcher, Universidad de Standford, CA), contra CD31 (un marcador de los vasos sanguíneos y linfáticos; BD Pharmingen), contra CD3 (BD Pharmingen), contra CD8 (Caltag) o con un Acm de control negativo (Hermes-1 contra el CD44 de humano). El anticuerpo contra la Ig de rata conjugado con FITC (Sigma) y diluido en PBS que contiene suero normal de ratón al 5% se utilizó como anticuerpo de la segunda etapa. Los cortes de los tejidos tumorales, las metástasis y los ganglios linfáticos también se tiñeron con anti-Clever-1 biotinilado seguido de estreptavidina-Alexa Fluor 546. Para la expresión de Foxp3, los cortes congelados se fijaron con paraformaldehído al 2%, se tiñeron con anti-Foxp3 (eBioscience) seguido de anticuerpo de conejo contra la Ig de rata conjugado con peroxidasa (Dako, Dinarmarca). Se utilizó como cromógeno hidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina en PBS que contiene peróxido de hidrógeno al 0,03% y los cortes se contratiñeron con hematoxilina. Los cortes se analizaron en un microscopio Olympus BX60 y con el programa informático cell^D versión 2.6 (Soft Imaging Solutions GmbH). Las tinciones de SPARC se analizaron con el programa informático Image J.

Inmunizaciones. Los conejos se inmunizaron en las almohadillas plantares con un cóctel (volumen de 200 µl) que contenía *Salmonella enteritidis* inactivada con calor, LPS de *E. coli* (10 mg) y seroalbúmina bovina (1 mg). Al mismo tiempo, los conejos recibieron el anticuerpo anti-Clever-1 (3-372, n = 5) o bien el anticuerpo de control negativo (NS-1, n = 5) a 2 mg/kg emparejado según la clase. Los conejos sin inmunizar se utilizaron como controles. Los tratamientos con anticuerpo se repitieron los días 2, 4, 7 y 9. La inmunización se repitió el día 7. Las muestras séricas se recogieron el día 7 y el 11, y las titulaciones de anticuerpo se analizaron por ELISA. Brevemente, las placas de microtitulación de poliestireno (Nunc, Roskilde, Dinamarca) se revistieron con concentraciones preanalizadas de LPS de *E. coli* (Difco Laboratories, Detroit, EE. UU.), SDS-extracto de *Salmonella enteritidis* y SAB (fracción V, ICN Biomedicals, Inc. Ohio, EE. UU.). Después de la incubación con las muestras de suero, los anticuerpos IgM e IgG en los pocillos se detectaron con anticuerpos contra la IgG de conejo (Dako Patts A/S, Copenhague, Dinamarca) y anticuerpos contra la IgM de conejo (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, EE. UU.) conjugados con fosfatasa alcalina. Las absorbancias se detectaron con un contador de multimarcación Victor (Wallac, Turku, Finlandia) a una longitud de onda de 405 nm.

Los ratones se inmunizaron en las almohadillas plantares por inyección subcutánea de 50 µg de ovalbúmina (OVA, grado V; Sigma, St. Louis, MO) en el adyuvante incompleto de Freund. Las inmunizaciones se repitieron tres veces (los días 0, 7 y 14). Los ratones se trataron una hora antes de la primera inmunización con una inyección subcutánea del anticuerpo anti-Clever-1 o del anticuerpo de control (NS-1), 50 µg/ratón, n = 6 + 6) y por vía intraperitoneal tres veces a la semana (100 µg/ratón). Los ratones se sacrificaron el día 17 y se recogieron los ganglios linfáticos poplíteos, los ganglios linfáticos inguinales y los bazos, y las células se aislaron para los análisis por citometría de flujo y para el ensayo de proliferación. Se homogenizaron los bazos y se lisaron los glóbulos rojos con disolución salina hipotónica. Los linfocitos T ($0{,}2 \times 10^6$) se cocultivaron con concentraciones crecientes (0 a 2 mg/ml) de OVA en placas de 96 pocillos con el fondo redondo. Los cocultivos se incubaron en el medio HEC durante 3 días y recibieron un pulso con ^{3}H-timidina (1 µCi [0,037 MBq] por pocillo) durante las 6 h finales. Las células se recogieron con un recogedor de placas semiautomático (Tomtech MACH III; Fisher Scientific, Hampton, NH) y se contaron con el contador Microbeta 1450 (Wallac). Los títulos de anticuerpo contra OVA se determinaron por ELISA tal y como está descrito (Stolen, C. M. et al., *Immunity* 22: 105-115). Los análisis de fenotipos se llevaron a cabo tal y como está explicado más arriba. Además, los linfocitos T reguladores FoxP3$^+$ se detectaron con un kit de eBioscience de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS

Efecto antitumoral:

Con el tratamiento de Clever-1, tanto el tumor primario como las metástasis de melanoma permanecen pequeños. Para estudiar si la acción selectiva sobre Clever-1 puede tener efectos beneficiosos sobre el desarrollo del tumor, utilizamos el modelo de melanoma B16 en el ratón. Tanto los tumores primarios en la oreja como las metástasis en los ganglios de la circulación linfática en el cuello alcanzaban solo aproximadamente el 30% del tamaño cuando se trataron con el anticuerpo anti-Clever-1 en comparación con los animales tratados de control (figura 1A, A-C). Ya que en el contexto clínico los tratamientos se empiezan después de haber diagnosticado el crecimiento maligno, también realizamos unos conjuntos de experimentos que imitan mejor el cuadro clínico. En estos experimentos, dejamos crecer los tumores tres días antes de comenzar el tratamiento con el anticuerpo y completamos el experimento bien el día 14 o el 20 después de las inyecciones de las células tumorales. De igual forma, en estas situaciones experimentales, el tratamiento con el anticuerpo fue eficaz, lo que condujo a que el día 20 hubiera una reducción estadísticamente significativa de los tumores primarios y de las metástasis (figuras 1B, A y B).

El tratamiento con anti-Clever-1 reduce el número de macrófagos de tipo 2 y de linfocitos T reguladores, pero no es antiangiogénico. La inhibición de la migración de las células de melanoma a través de los vasos linfáticos aferentes en los ganglios de la circulación linfática podía explicar el menor tamaño de las metástasis tras el tratamiento con el anticuerpo. Sin embargo, no puede explicar el pequeño tamaño de los tumores primarios. Por lo tanto, analizamos el número de subpoblaciones diferentes de vasos y de leucocitos infiltrados en el tumor. El número de leucocitos infiltrados en el tumor pudo reflejar la eficacia de la respuesta inmunitaria antitumoral y el número de vasos de la

actividad angiogénica que controla el crecimiento del tumor (Dirkx, A. E. et al. *J. Leukoc. Biol*. 80: 1183-1196). El último aspecto es también relevante en lo que respecta al propio Clever-1, porque se ha descrito que contribuye a la angiogénesis *in vitro* (Adachi, H. y Tsujimoto, M. 2002. *J. Biol. Chem*. 277: 34264-34270). El número de macrófagos de tipo 2 y de linfocitos T reguladores disminuyó enormemente tanto en los tumores primarios como en las metástasis (figuras 2A y 2B). Esta reducción fue selectiva, ya que el número de células $CD3^+$ y $CD8^+$ era comparable en ambos grupos de tratamiento (figuras 2C y 2D). El número de vasos sanguíneos y linfáticos ($CD31^+$ y/o $PV\text{-}1^+$) y su densidad eran los mismos después del tratamiento con anticuerpos anti-Clever-1 y de control (figuras 2E y 2F). Así pues, el número de tipos de células inmunitarias reguladoras disminuye después de la acción selectiva sobre Clever-1, pero tanto la vasculatura sanguínea como la linfática parece que permanecen intactas.

Los macrófagos de tipo 2 en el melanoma son positivos para Clever-1 y el tratamiento con el anticuerpo no los elimina por completo. Una posible explicación para la disminución del número de macrófagos de tipo 2 después del tratamiento con anti-Clever-1 es que el tratamiento destruye los macrófagos que expresan Clever-1 mediante la muerte mediada por el complemento. Sin embargo, este no es el caso del 50,3 ± 16,9 % de los macrófagos de tipo 2 en anti-Clever-1, y el 65,9 ± 16,7% de los tumores tratados con el anticuerpo de control expresan la Clever-1 en los tumores primarios (figura 3A), aunque su cifra absoluta disminuye enormemente debido al tratamiento con el anticuerpo (figura 2B). En este contexto, sin embargo, se debe observar que los macrófagos que expresan Clever-1 eran más pequeños y más atenuados después del tratamiento con anti-Clever-1 que después del tratamiento con el control.

El tratamiento con anticuerpos no deteriora significativamente la respuesta inmunitaria normal. Ya que el bloqueo de Clever-1 impide de manera significativa la migración de las células tumorales y de los linfocitos hacia los ganglios de la circulación linfática, también podría afectar a la respuesta inmunitaria normal. Comprobamos esta posibilidad tanto en los modelos de conejo como de ratón. Los conejos se trataron con el anticuerpo anti-Clever-1 o bien con uno de control, y se inmunizaron en la almohadilla plantar con SAB, *Salmonella enteritidis* y LPS de *E. coli* (figura 4). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las respuestas de anticuerpos de las clases IgM e IgG. Las únicas excepciones fueron las ligeras disminuciones de la respuesta de IgM el día 7 en SAB y el día 11 en *Salmonella enteritidis* en los conejos tratados con el anticuerpo anti-Clever-1. Los ratones se inmunizaron en las almohadillas plantares con OVA. Resultaron comparables el número absoluto de linfocitos y los porcentajes de las diferentes subpoblaciones en los ganglios linfáticos y en el bazo de ambos grupos de tratamiento (figuras 5A-C), al igual que las respuestas de linfocitos T y B específicos de OVA (figura 5D). A diferencia de los macrófagos de tipo 2 positivos para MR dentro del melanoma, los macrófagos positivos para MR no expresaban Clever-1 en los ganglios linfáticos poplíteos de los ratones normales e inmunizados, mientras que el endotelio linfático era positivo para Clever-1 (figuras 3B y 3C). De igual forma, los macrófagos positivos para MR dentro de los ganglios linfáticos eran notablemente más pequeños que en los tumores, lo que sugiere que los macrófagos MR^+/Clever-1^+ dentro del tumor son un subtipo único.

Para encontrar un mecanismo que explicaría el escaso número de macrófagos de tipo 2 en los tumores, comprobamos si se inhibía la entrada de ellos o de sus precursores durante el tratamiento con el anticuerpo. Primero, analizamos la expresión de Clever-1/Estabilina-1 en la vasculatura tumoral. La mayoría de los vasos dentro del tumor son más grandes con una luz bien amplia y, a diferencia de los vasos normales con pared plana, expresan Clever-1/Estabilina-1. Se confirmó esta expresión con dos anticuerpos diferentes contra Clever-1/Estabilina-1 (figura 6, A y B). Después recogimos los tumores de los animales tratados tanto con el anticuerpo de control como con el anti-Clever-1/Estabilina-1, y comprobamos la fijación de los leucocitos infiltrados en el tumor, y de los linfocitos T $CD4^+$ de la sangre periférica, a los vasos en esos tumores *ex vivo*. Tanto los leucocitos grandes infiltrados en el tumor que constan de macrófagos y células mieloides, como los linfocitos pequeños infiltrados en el tumor, se fijaban poco a los vasos tumorales de los animales tratados con Clever-1/Estabilina-1. También se redujo la adhesión de los linfocitos $CD4^+$ de la sangre (figura 6C). Estos hallazgos demuestran que el tratamiento de bloqueo de Clever-1 impide que los monocitos/macrófagos y los linfocitos se fijen al sistema vascular del tumor. Como resultado, se reduce el desarrollo de los macrófagos de tipo 3. Sin el bloqueo de Clever-1, se desarrollarán y se diferenciarán en el tejido tumoral los macrófagos de tipo 3 que se originan a partir de los monocitos que entran en el torrente circulatorio.

Discusión

Efecto antitumoral:

Nuestro trabajo demuestra que el tratamiento con el anticuerpo anti-Clever-1 actúa selectivamente sobre un subconjunto único de macrófagos supresores presentes en los tumores y lleva a la reducción del número de linfocitos T reguladores. Es importante señalar que el tratamiento con el anticuerpo no amortigua notablemente la respuesta inmunitaria contra los diferentes antígenos probados. Aunque el trabajo se ha realizado con melanoma como modelo tumoral, nuestros experimentos preliminares con el modelo de linfoma EL-4 indica que los hallazgos descritos en este trabajo no se limitan al melanoma.

Sólo unas pocas moléculas presentes en los vasos linfáticos aferentes, tales como el receptor de manosa de los macrófagos, el receptor de la esfingosina-1-fosfato y CCL21, que se ha demostrado que intervienen en el tráfico de

los linfocitos a través de los vasos linfáticos aferentes (Marttila-Ichihara, F. et al. *Blood* 112: 64-72). Entre ellas, Clever-1 es la primera, que ahora se ha demostrado que está implicada en ello, y que se puede tratar con fármacos, también en la rama supresora de la respuesta inmunitaria contra el cáncer.

Los macrófagos asociados al tumor se diferencian en macrófagos de tipo 2 dentro del entorno tumoral a partir de los monocitos sanguíneos que entran (24). Para la diferenciación podría necesitarse que las células entren en contacto directo, porque los macrófagos del peritoneo (fuera del tumor) no se vuelven positivos para MR en presencia del melanoma dentro de la cavidad peritoneal en nuestros experimentos (no se muestran los datos). Aproximadamente el 65% de los macrófagos tumorales de tipo 2 que dan positivo para MR expresan Clever-1. Es interesante que el tratamiento con el anticuerpo anti-Clever-1 disminuyera tanto el número de macrófagos MR^+/Clever-1^+ como de MR^+/Clever-1^-. La presencia de los macrófagos MR^+/Clever-1^+ dentro del tumor después del tratamiento con el anticuerpo sugiere que el anticuerpo no conduce a estas células hacia la destrucción mediada por el complemento. Por otra parte, la reducción del número de macrófagos MR^+/Clever-1^- podría indicar que estas células también expresan poca cantidad de Clever-1 y que la acción selectiva sobre Clever-1 impide la diferenciación de dichas células. Como alternativa, la inhibición de Clever-1 podría tener la capacidad de conducir a que cambie el contenido de SPARC dentro del tumor, lo que limita el número de macrófagos supresores a pesar de su estado de expresión de Clever-1. También se ha demostrado que la SPARC que sufre endocitosis debido a Clever-1 es un componente importante que controla el crecimiento y la diseminación de tumor en varios tipos de cánceres (Said, N. et al. *Mol. Cancer. Res*. 5: 1015-1030; Chlenski, A. et al. *Cancer Res*. 62: 7357-7363; Chlenski, A. et al. *Int. J. Cancer* 118: 310-316 y Brekken, R. A. et al., *J. Clin. Invest.* 111: 487-495) y también pudo regular el crecimiento tumoral en nuestro contexto.

Se podría descartar la intervención del Clever-1 vascular en la entrada al melanoma de los monocitos que vienen por la sangre, porque los vasos sanguíneos del melanoma B16 no expresan Clever-1. Desde el punto de vista teórico, también es posible que Clever-1 en los monocitos/macrófagos esté implicado en su entrada desde la sangre hacia los tumores primarios, y el tratamiento con el anticuerpo inhibe dicha función.

Los macrófagos de tipo 2 secretan la IL-10, que es inmunosupresora, y diferentes quimiocinas, en concreto CCL17 y CCL22, que atraen a los linfocitos T reguladores $CCR4^+$ (Sica, A et al. *Cancer Lett*. 267: 204-215). Por lo tanto, la reducción de los linfocitos T reguladores observada en nuestro trabajo podría ser considerada una consecuencia de la reducción de los macrófagos de tipo 2, en particular de los que expresan Clever-1, esto es, los macrófagos de tipo 3. La disminución de su número y de su capacidad funcional podría también reducir la supresión de las células tumorales específica del antígeno y el equilibrio inmunitario total cambia de protumoral a antitumoral.

Es importante que, a pesar de que el tratamiento con el anticuerpo era eficaz en el tratamiento del tumor, no disminuyó notablemente la respuesta inmunitaria contra diferentes tipos de antígenos. Las razones que hay detrás de esto podrían ser que los antígenos entran en los ganglios linfáticos en cantidad suficiente para crear la respuesta inmunitaria. Además, aunque el tratamiento reduce supuestamente el tráfico de entrada y salida de linfocitos desde el ganglio linfático en el que está llevando a cabo la respuesta inmunitaria, no altera significativamente el equilibrio entre la entrada de linfocitos a través de las VEA y su salida desde los ganglios linfáticos. Los anticuerpos, una vez creados, parecen circular por el cuerpo con independencia de Clever-1. Notablemente, los macrófagos que hay dentro de los ganglios linfáticos durante la respuesta inmunitaria seguían sin expresar Clever-1, aunque muchos de ellos expresaban brillantemente el MR. Esto indica que los macrófagos positivos para MR dentro de los tumores y de los ganglios linfáticos que en los que se está llevando a cabo la respuesta inmunitaria pertenecen a subtipos diferentes. Esto también podría explicar por qué el tratamiento con el anticuerpo que actúa selectivamente sobre Clever-1 durante la inmunización no tiene ningún efecto sobre el número de macrófagos positivos para MR ni sobre los linfocitos T reguladores.

En resumen, nuestros resultados indican que Clever-1 está implicado en diferentes puntos del control que determinan el crecimiento y la diseminación del cáncer. Como el tratamiento satisfactorio de los pacientes con cáncer requiere con frecuencia diferentes combinaciones de fármacos, el anticuerpo anti-Clever-1 u otro antagonista de Clever-1 podría ser una adición beneficiosa al arsenal terapéutico utilizado para luchar contra el cáncer.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Faron Pharmaceuticals Oy

<120> Una nueva célula y métodos terapéuticos y diagnósticos basados en ella

<130> FP1058

<150>
<151>

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
<211> 7879
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> exon
<222> (31) .. (7740)

<400> 1

```
actctgtcct ggacagcgtg cccaccagcc atg gcg ggg ccc cgg ggc ctc ctc      54
                                 Met Ala Gly Pro Arg Gly Leu Leu
                                 1               5

cca ctc tgc ctc ctg gcc ttc tgc ctg gca ggc ttc agc ttc gtc agg      102
Pro Leu Cys Leu Leu Ala Phe Cys Leu Ala Gly Phe Ser Phe Val Arg
    10                  15                  20

ggg cag gtg ctg ttc aaa ggc tgt gat gtg aaa acc acg ttt gtc act      150
Gly Gln Val Leu Phe Lys Gly Cys Asp Val Lys Thr Thr Phe Val Thr
25                  30                  35                  40

cat gta ccc tgc acc tcg tgc gcg gcc atc aag aag cag acg tgt ccc      198
His Val Pro Cys Thr Ser Cys Ala Ala Ile Lys Lys Gln Thr Cys Pro
                45                  50                  55

tca ggc tgg ctg cgg gag ctc ccg gat cag ata acc cag gac tgc cgc      246
Ser Gly Trp Leu Arg Glu Leu Pro Asp Gln Ile Thr Gln Asp Cys Arg
            60                  65                  70

tac gaa gta cag ctg ggg ggc tct atg gtg tcc atg agc ggc tgc aga      294
Tyr Glu Val Gln Leu Gly Gly Ser Met Val Ser Met Ser Gly Cys Arg
        75                  80                  85

cgg aag tgc cgg aag caa gtg gtg cag aag gcc tgc tgc cct ggc tac      342
Arg Lys Cys Arg Lys Gln Val Val Gln Lys Ala Cys Cys Pro Gly Tyr
    90                  95                  100

tgg ggt tcc cgg tgc cat gaa tgc cct ggg ggc gct gag acc cca tgc      390
Trp Gly Ser Arg Cys His Glu Cys Pro Gly Gly Ala Glu Thr Pro Cys
105                 110                 115                 120

aat ggc cac ggg acc tgc ttg gat ggc atg gac agg aat ggg acc tgt      438
```

```
Asn Gly His Gly Thr Cys Leu Asp Gly Met Asp Arg Asn Gly Thr Cys
                125                 130                 135

gtg tgc cag gaa aac ttc cgc ggc tca gcc tgc cag gag tgc caa gac      486
Val Cys Gln Glu Asn Phe Arg Gly Ser Ala Cys Gln Glu Cys Gln Asp
            140                 145                 150

ccc aac cgg ttc ggg cct gac tgc caa tcg gtg tgc agc tgt gtg cac      534
Pro Asn Arg Phe Gly Pro Asp Cys Gln Ser Val Cys Ser Cys Val His
        155                 160                 165

gga gtg tgc aac cat ggg cca cgt ggg gat gga agc tgc ctg tgc ttt      582
Gly Val Cys Asn His Gly Pro Arg Gly Asp Gly Ser Cys Leu Cys Phe
    170                 175                 180

gct gga tac act ggc ccc cac tgt gat caa gag ctg ccc gtc tgc cag      630
Ala Gly Tyr Thr Gly Pro His Cys Asp Gln Glu Leu Pro Val Cys Gln
185                 190                 195                 200

gag ctg cgc tgt ccc cag aac acc cag tgc tcc gca gag gct ccc agc      678
Glu Leu Arg Cys Pro Gln Asn Thr Gln Cys Ser Ala Glu Ala Pro Ser
                205                 210                 215

tgc agg tgc ctg ccc ggc tac aca cag cag ggc agt gaa tgc cga gcc      726
Cys Arg Cys Leu Pro Gly Tyr Thr Gln Gln Gly Ser Glu Cys Arg Ala
            220                 225                 230

ccc aac ccc tgc tgg cca tca ccc tgc tca ctg ctg gcc cag tgc tcg      774
Pro Asn Pro Cys Trp Pro Ser Pro Cys Ser Leu Leu Ala Gln Cys Ser
        235                 240                 245

gtg agc ccc aag ggg cag gct cag tgt cac tgc cct gag aac tac cat      822
Val Ser Pro Lys Gly Gln Ala Gln Cys His Cys Pro Glu Asn Tyr His
    250                 255                 260

ggc gat ggg atg gtg tgt ctg ccc aag gac cca tgc act gac aac ctt      870
Gly Asp Gly Met Val Cys Leu Pro Lys Asp Pro Cys Thr Asp Asn Leu
265                 270                 275                 280

ggt ggc tgc ccc agc aac tct act ttg tgt gtg tac cag aag ccg ggc      918
Gly Gly Cys Pro Ser Asn Ser Thr Leu Cys Val Tyr Gln Lys Pro Gly
                285                 290                 295

cag gcc ttc tgc acc tgc cgg cca ggc ctg gtc agc atc aac agc aac      966
Gln Ala Phe Cys Thr Cys Arg Pro Gly Leu Val Ser Ile Asn Ser Asn
            300                 305                 310

gct tct gcg ggc tgc ttc gcc ttc tgc tcc ccc ttc tcc tgc gac cgg     1014
Ala Ser Ala Gly Cys Phe Ala Phe Cys Ser Pro Phe Ser Cys Asp Arg
        315                 320                 325

tct gcc act tgc cag gtg acc gct gat ggg aag acc agc tgt gtg tgc     1062
Ser Ala Thr Cys Gln Val Thr Ala Asp Gly Lys Thr Ser Cys Val Cys
    330                 335                 340

agg gaa agc gag gtg ggg gat ggg cgt gcc tgc tac gga cac ctg ctc     1110
Arg Glu Ser Glu Val Gly Asp Gly Arg Ala Cys Tyr Gly His Leu Leu
345                 350                 355                 360

cac gag gtg cag aag gcc acg cag aca ggc cgg gtg ttc ctg cag ctg     1158
```

```
His Glu Val Gln Lys Ala Thr Gln Thr Gly Arg Val Phe Leu Gln Leu
                365                 370                 375

agg gtc gcc gtg gcc atg atg gac cag ggc tgc cgg gaa atc ctt acc      1206
Arg Val Ala Val Ala Met Met Asp Gln Gly Cys Arg Glu Ile Leu Thr
            380                 385                 390

aca gcg ggc cct ttc acc gtg ctg gtg cca tcc gtc tcc tcc ttc tcc      1254
Thr Ala Gly Pro Phe Thr Val Leu Val Pro Ser Val Ser Ser Phe Ser
        395                 400                 405

tcc agg acc atg aat gca tcc ctt gcc cag cag ctc tgt aga cag cac      1302
Ser Arg Thr Met Asn Ala Ser Leu Ala Gln Gln Leu Cys Arg Gln His
    410                 415                 420

atc atc gca ggg cag cac atc ctg gag gac aca agg acc caa caa aca      1350
Ile Ile Ala Gly Gln His Ile Leu Glu Asp Thr Arg Thr Gln Gln Thr
425                 430                 435                 440

cga agg tgg tgg acg ctg gcc ggg cag gag atc acc gtc acc ttt aac      1398
Arg Arg Trp Trp Thr Leu Ala Gly Gln Glu Ile Thr Val Thr Phe Asn
                445                 450                 455

caa ttc acg aaa tac tcc tac aag tac aaa gac cag ccc cag cag acg      1446
Gln Phe Thr Lys Tyr Ser Tyr Lys Tyr Lys Asp Gln Pro Gln Gln Thr
            460                 465                 470

ttc aac atc tac aag gcc aac aac ata gca gct aat ggc gtc ttc cac      1494
Phe Asn Ile Tyr Lys Ala Asn Asn Ile Ala Ala Asn Gly Val Phe His
        475                 480                 485

gtg gtc act ggc ctg cgg tgg cag gcc ccc tct ggg acc cct ggg gat      1542
Val Val Thr Gly Leu Arg Trp Gln Ala Pro Ser Gly Thr Pro Gly Asp
    490                 495                 500

ccc aag aga act atc gga cag atc ctc gcc tct acc gag gcc ttc agc      1590
Pro Lys Arg Thr Ile Gly Gln Ile Leu Ala Ser Thr Glu Ala Phe Ser
505                 510                 515                 520

cgc ttt gaa acc atc ctg gag aac tgt ggg ctg ccc tcc atc ctg gac      1638
Arg Phe Glu Thr Ile Leu Glu Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ile Leu Asp
                525                 530                 535

gga cct ggg ccc ttc aca gtc ttt gcc cca agc aat gag gct gtg gac      1686
Gly Pro Gly Pro Phe Thr Val Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Val Asp
            540                 545                 550

agc ttg cgt gac ggc cgc ctg atc tac ctc ttc aca gcg ggt ctc tct      1734
Ser Leu Arg Asp Gly Arg Leu Ile Tyr Leu Phe Thr Ala Gly Leu Ser
        555                 560                 565

aaa ctg cag gag ttg gtg cgg tac cac atc tac aac cac ggc cag ctg      1782
Lys Leu Gln Glu Leu Val Arg Tyr His Ile Tyr Asn His Gly Gln Leu
    570                 575                 580

acc gtt gag aag ctc atc tcc aag ggt cgg atc ctc acc atg gcg aac      1830
Thr Val Glu Lys Leu Ile Ser Lys Gly Arg Ile Leu Thr Met Ala Asn
585                 590                 595                 600

cag gtc ctg gct gtg aac att tct gag gag ggg cgc atc ctg ctg gga      1878
```

```
Gln Val Leu Ala Val Asn Ile Ser Glu Glu Gly Arg Ile Leu Leu Gly
                605                 610                 615

ccc gag ggg gtc ccg ctg cag agg gta gac gtg atg gcc gcc aat ggt     1926
Pro Glu Gly Val Pro Leu Gln Arg Val Asp Val Met Ala Ala Asn Gly
            620                 625                 630

gtg atc cac atg ctg gac ggc atc ctg ctg ccc ccg acc atc ctg ccc     1974
Val Ile His Met Leu Asp Gly Ile Leu Leu Pro Pro Thr Ile Leu Pro
        635                 640                 645

atc ctg ccc aag cac tgc agc gag gag cag cac aag att gtg gcg ggc     2022
Ile Leu Pro Lys His Cys Ser Glu Glu Gln His Lys Ile Val Ala Gly
    650                 655                 660

tcc tgt gtg gac tgc caa gcc ctg aac acc agc acg tgt ccc ccc aac     2070
Ser Cys Val Asp Cys Gln Ala Leu Asn Thr Ser Thr Cys Pro Pro Asn
665                 670                 675                 680

agt gtg aag ctg gac atc ttc ccc aag gag tgt gtc tac atc cat gac     2118
Ser Val Lys Leu Asp Ile Phe Pro Lys Glu Cys Val Tyr Ile His Asp
                685                 690                 695

cca acg ggg ctc aat gtg cta aag aag ggc tgt gcc agc tac tgc aac     2166
Pro Thr Gly Leu Asn Val Leu Lys Lys Gly Cys Ala Ser Tyr Cys Asn
            700                 705                 710

caa acc atc atg gaa caa ggc tgc tgc aaa ggt ttt ttc ggg cct gac     2214
Gln Thr Ile Met Glu Gln Gly Cys Cys Lys Gly Phe Phe Gly Pro Asp
        715                 720                 725

tgc acg cag tgt cct ggg ggc ttc tcc aac ccc tgc tat ggc aaa ggc     2262
Cys Thr Gln Cys Pro Gly Gly Phe Ser Asn Pro Cys Tyr Gly Lys Gly
    730                 735                 740

aat tgc agt gat ggg atc cag ggc aat ggg gcc tgc ctc tgc ttc cca     2310
Asn Cys Ser Asp Gly Ile Gln Gly Asn Gly Ala Cys Leu Cys Phe Pro
745                 750                 755                 760

gac tac aag ggc atc gcc tgc cac atc tgc tcg aac cca aac aag cat     2358
Asp Tyr Lys Gly Ile Ala Cys His Ile Cys Ser Asn Pro Asn Lys His
                765                 770                 775

gga gag caa tgc cag gaa gac tgc ggc tgt gtc cat ggt ctc tgc gac     2406
Gly Glu Gln Cys Gln Glu Asp Cys Gly Cys Val His Gly Leu Cys Asp
            780                 785                 790

aac cgc cca ggc agt ggg ggg gtg tgc cag cag ggc acg tgt gcc cct     2454
Asn Arg Pro Gly Ser Gly Gly Val Cys Gln Gln Gly Thr Cys Ala Pro
        795                 800                 805

ggc ttc agt ggc cgg ttc tgc aac gag tcc atg ggg gac tgt ggg ccc     2502
Gly Phe Ser Gly Arg Phe Cys Asn Glu Ser Met Gly Asp Cys Gly Pro
    810                 815                 820

aca ggg ctg gcc cag cac tgc cac ctg cat gcc cgc tgt gtt agc cag     2550
Thr Gly Leu Ala Gln His Cys His Leu His Ala Arg Cys Val Ser Gln
825                 830                 835                 840

gag ggt gtt gcc aga tgt cgc tgt ctt gat ggc ttt gag ggt gat ggc     2598
```

```
Glu Gly Val Ala Arg Cys Arg Cys Leu Asp Gly Phe Glu Gly Asp Gly
                845                 850                 855

ttc tcc tgc aca cct agc aac ccc tgc tcc cac ccg gac cgt gga ggc      2646
Phe Ser Cys Thr Pro Ser Asn Pro Cys Ser His Pro Asp Arg Gly Gly
            860                 865                 870

tgc tca gag aat gct gag tgt gtc cct ggg tcc ctg ggc acc cac cac      2694
Cys Ser Glu Asn Ala Glu Cys Val Pro Gly Ser Leu Gly Thr His His
        875                 880                 885

tgc aca tgc cac aaa ggc tgg agt ggg gat ggc cgc gtc tgt gtg gct      2742
Cys Thr Cys His Lys Gly Trp Ser Gly Asp Gly Arg Val Cys Val Ala
    890                 895                 900

att gac gag tgt gag ctg gac gtg aga ggt ggc tgc cac acc gat gcc      2790
Ile Asp Glu Cys Glu Leu Asp Val Arg Gly Gly Cys His Thr Asp Ala
905                 910                 915                 920

ctc tgc agc tat gtg ggc ccc ggg cag agc cga tgc acc tgc aag ctg      2838
Leu Cys Ser Tyr Val Gly Pro Gly Gln Ser Arg Cys Thr Cys Lys Leu
                925                 930                 935

ggc ttt gcc ggg gat ggc tac cag tgc agc ccc atc gac ccc tgc cgg      2886
Gly Phe Ala Gly Asp Gly Tyr Gln Cys Ser Pro Ile Asp Pro Cys Arg
            940                 945                 950

gca ggc aat ggc ggc tgc cac ggc ctg gcc acc tgc cgg gca gtg ggg      2934
Ala Gly Asn Gly Gly Cys His Gly Leu Ala Thr Cys Arg Ala Val Gly
        955                 960                 965

gga ggt cag cgg gtc tgc acg tgc ccc cct ggc ttt ggg ggt gat ggc      2982
Gly Gly Gln Arg Val Cys Thr Cys Pro Pro Gly Phe Gly Gly Asp Gly
    970                 975                 980

ttc agc tgt tat gga gac atc ttc cgg gag ctg gag gca aat gcc cac      3030
Phe Ser Cys Tyr Gly Asp Ile Phe Arg Glu Leu Glu Ala Asn Ala His
985                 990                 995                 1000

ttc tcc atc ttc tac  caa tgg ctt aag agt  gcc ggc atc acg ctt        3075
Phe Ser Ile Phe Tyr  Gln Trp Leu Lys Ser  Ala Gly Ile Thr Leu
                1005                1010                1015

cct gcc gac cgc cga  gtc aca gcc ctg gtg  ccc tcc gag gct gca        3120
Pro Ala Asp Arg Arg  Val Thr Ala Leu Val  Pro Ser Glu Ala Ala
                1020                1025                1030

gtc cgt cag ctg agc  ccc gag gac cga gct  ttc tgg ctg cag cca        3165
Val Arg Gln Leu Ser  Pro Glu Asp Arg Ala  Phe Trp Leu Gln Pro
                1035                1040                1045

agg acg ctg ccg aac  ctg gtc agg gcc cat  ttt ctc cag ggt gcc        3210
Arg Thr Leu Pro Asn  Leu Val Arg Ala His  Phe Leu Gln Gly Ala
                1050                1055                1060

ctc ttc gag gag gag  ctg gcc cgg ctg ggt  ggg cag gaa gtg gcc        3255
Leu Phe Glu Glu Glu  Leu Ala Arg Leu Gly  Gly Gln Glu Val Ala
                1065                1070                1075

acc ctg aac ccc acc  aca cgc tgg gag att  cgc aac att agt ggg        3300
```

```
Thr Leu Asn Pro Thr  Thr Arg Trp Glu Ile  Arg Asn Ile Ser Gly
                1080                1085                1090

agg gtc tgg gtg cag  aat gcc agc gtg gat  gtg gct gac ctc ctt      3345
Arg Val Trp Val Gln  Asn Ala Ser Val Asp  Val Ala Asp Leu Leu
                1095                1100                1105

gcc acc aac ggt gtc  cta cac atc ctc agc  cag gtc tta ctg ccc      3390
Ala Thr Asn Gly Val  Leu His Ile Leu Ser  Gln Val Leu Leu Pro
                1110                1115                1120

ccc cga ggg gat gtg  ccc ggt ggg cag ggg  ttg ctg cag cag ctg      3435
Pro Arg Gly Asp Val  Pro Gly Gly Gln Gly  Leu Leu Gln Gln Leu
                1125                1130                1135

gac ttg gtg cct gcc  ttc agc ctc ttc cgg  gaa ttg ctg cag cac      3480
Asp Leu Val Pro Ala  Phe Ser Leu Phe Arg  Glu Leu Leu Gln His
                1140                1145                1150

cat ggg ttg gtg ccc  cag att gag gct gcc  act gcc tac acc atc      3525
His Gly Leu Val Pro  Gln Ile Glu Ala Ala  Thr Ala Tyr Thr Ile
                1155                1160                1165

ttt gtg ccc acc aac  cgc tcc ctg gag gcc  cag ggc aac agc agt      3570
Phe Val Pro Thr Asn  Arg Ser Leu Glu Ala  Gln Gly Asn Ser Ser
                1170                1175                1180

cac ctg gac gca gac  aca gtg cgg cac cat  gtg gtc ctg ggg gag      3615
His Leu Asp Ala Asp  Thr Val Arg His His  Val Val Leu Gly Glu
                1185                1190                1195

gcc ctc tcc atg gaa  acc ctg cgg aag ggt  gga cac cgc aac tcc      3660
Ala Leu Ser Met Glu  Thr Leu Arg Lys Gly  Gly His Arg Asn Ser
                1200                1205                1210

ctc ctg ggc cct gcc  cac tgg atc gtc ttc  tac aac cac agt ggc      3705
Leu Leu Gly Pro Ala  His Trp Ile Val Phe  Tyr Asn His Ser Gly
                1215                1220                1225

cag cct gag gtg aac  cat gtg cca ctg gaa  ggc ccc atg ctg gag      3750
Gln Pro Glu Val Asn  His Val Pro Leu Glu  Gly Pro Met Leu Glu
                1230                1235                1240

gcc cct ggc cgc tcg  ctg att ggt ctg tcg  ggg gtc ctg acg gtg      3795
Ala Pro Gly Arg Ser  Leu Ile Gly Leu Ser  Gly Val Leu Thr Val
                1245                1250                1255

ggc tca agt cgc tgc  ctg cat agc cac gct  gag gcc ctg cgg gag      3840
Gly Ser Ser Arg Cys  Leu His Ser His Ala  Glu Ala Leu Arg Glu
                1260                1265                1270

aaa tgt gta aac tgc  acc agg aga ttc cgc  tgc act cag ggc ttc      3885
Lys Cys Val Asn Cys  Thr Arg Arg Phe Arg  Cys Thr Gln Gly Phe
                1275                1280                1285

cag ctg cag gac aca  ccc agg aag agc tgt  gtc tac cga tct ggc      3930
Gln Leu Gln Asp Thr  Pro Arg Lys Ser Cys  Val Tyr Arg Ser Gly
                1290                1295                1300

ttc tcc ttc tcc cgg  ggc tgc tct tac aca  tgt gcc aag aag atc      3975
```

```
Phe Ser Phe Ser Arg  Gly Cys Ser Tyr Thr  Cys Ala Lys Lys Ile
                1305                1310                1315

cag gtg ccg gac tgc  tgc cct ggt ttc ttt  ggc acg ctg tgt gag      4020
Gln Val Pro Asp Cys  Cys Pro Gly Phe Phe  Gly Thr Leu Cys Glu
                1320                1325                1330

cca tgc cca ggg ggt  cta ggg ggg gtg tgc  tca ggc cat ggg cag      4065
Pro Cys Pro Gly Gly  Leu Gly Gly Val Cys  Ser Gly His Gly Gln
                1335                1340                1345

tgc cag gac agg ttc  ctg ggc agc ggg gag  tgc cac tgc cac gag      4110
Cys Gln Asp Arg Phe  Leu Gly Ser Gly Glu  Cys His Cys His Glu
                1350                1355                1360

ggc ttc cat gga acg  gcc tgt gag gtg tgt  gag ctg ggc cgc tac      4155
Gly Phe His Gly Thr  Ala Cys Glu Val Cys  Glu Leu Gly Arg Tyr
                1365                1370                1375

ggg ccc aac tgc acc  gga gtg tgt gac tgt  gcc cat ggg ctg tgc      4200
Gly Pro Asn Cys Thr  Gly Val Cys Asp Cys  Ala His Gly Leu Cys
                1380                1385                1390

cag gag ggg ctg caa  ggg gac gga agc tgt  gtc tgt aac gtg ggc      4245
Gln Glu Gly Leu Gln  Gly Asp Gly Ser Cys  Val Cys Asn Val Gly
                1395                1400                1405

tgg cag ggc ctc cgc  tgt gac cag aaa atc  acc agc cct cag tgc      4290
Trp Gln Gly Leu Arg  Cys Asp Gln Lys Ile  Thr Ser Pro Gln Cys
                1410                1415                1420

cct agg aag tgc gac  ccc aat gcc aac tgc  gtg cag gac tcg gcc      4335
Pro Arg Lys Cys Asp  Pro Asn Ala Asn Cys  Val Gln Asp Ser Ala
                1425                1430                1435

gga gcc tcc acc tgc  gcc tgt gct gcg gga  tac tcc ggc aat ggc      4380
Gly Ala Ser Thr Cys  Ala Cys Ala Ala Gly  Tyr Ser Gly Asn Gly
                1440                1445                1450

atc ttc tgt tca gag  gtg gac ccc tgc gcc  cac ggc cat ggg ggc      4425
Ile Phe Cys Ser Glu  Val Asp Pro Cys Ala  His Gly His Gly Gly
                1455                1460                1465

tgc tcc cct cat gcc  aac tgt acc aag gtg  gca cct ggg cag cgg      4470
Cys Ser Pro His Ala  Asn Cys Thr Lys Val  Ala Pro Gly Gln Arg
                1470                1475                1480

aca tgc acc tgc cag  gat ggc tac atg ggc  gac ggg gag ctg tgc      4515
Thr Cys Thr Cys Gln  Asp Gly Tyr Met Gly  Asp Gly Glu Leu Cys
                1485                1490                1495

cag gaa att aac agc  tgt ctc atc cac cac  ggg ggc tgc cac att      4560
Gln Glu Ile Asn Ser  Cys Leu Ile His His  Gly Gly Cys His Ile
                1500                1505                1510

cac gcc gag tgc atc  ccc act ggc ccc cag  cag gtc tcc tgc agc      4605
His Ala Glu Cys Ile  Pro Thr Gly Pro Gln  Gln Val Ser Cys Ser
                1515                1520                1525

tgc cgt gag ggt tac  agc ggg gat ggc atc  cgg acc tgc gag ctc      4650
```

```
Cys Arg Glu Gly Tyr  Ser Gly Asp Gly Ile  Arg Thr Cys Glu Leu
                1530                1535                1540

ctg gac ccc tgc tct  aag aac aat gga gga  tgc agc cca tat gcc      4695
Leu Asp Pro Cys Ser  Lys Asn Asn Gly Gly  Cys Ser Pro Tyr Ala
                1545                1550                1555

acc tgc aaa agc aca  ggg gat ggc cag agg  aca tgt acc tgc gac      4740
Thr Cys Lys Ser Thr  Gly Asp Gly Gln Arg  Thr Cys Thr Cys Asp
                1560                1565                1570

aca gcc cac acc gtg  ggg gac ggc ctc acc  tgc cgt gcc cga gtc      4785
Thr Ala His Thr Val  Gly Asp Gly Leu Thr  Cys Arg Ala Arg Val
                1575                1580                1585

ggc ctg gag ctc ctg  agg gat aag cat gcc  tca ttc ttc agc ctc      4830
Gly Leu Glu Leu Leu  Arg Asp Lys His Ala  Ser Phe Phe Ser Leu
                1590                1595                1600

cgc ctc ctg gaa tat  aag gag ctc aag ggc  gat ggg cct ttc acc      4875
Arg Leu Leu Glu Tyr  Lys Glu Leu Lys Gly  Asp Gly Pro Phe Thr
                1605                1610                1615

atc ttc gtg ccg cac  gca gat cta atg agc  aac ctg tcg cag gat      4920
Ile Phe Val Pro His  Ala Asp Leu Met Ser  Asn Leu Ser Gln Asp
                1620                1625                1630

gag ctg gcc cgg att  cgt gcg cat cgc cag  ctg gtg ttt cgc tac      4965
Glu Leu Ala Arg Ile  Arg Ala His Arg Gln  Leu Val Phe Arg Tyr
                1635                1640                1645

cac gtg gtt ggc tgt  cgg cgg ctg cgg agc  gag gac ctg ctg gag      5010
His Val Val Gly Cys  Arg Arg Leu Arg Ser  Glu Asp Leu Leu Glu
                1650                1655                1660

cag ggg tac gcc acg  gcc ctc tca ggg cac  cca ctg cgc ttc agc      5055
Gln Gly Tyr Ala Thr  Ala Leu Ser Gly His  Pro Leu Arg Phe Ser
                1665                1670                1675

gag agg gag ggc agc  ata tac ctc aat gac  ttc gcg cgc gtg gtg      5100
Glu Arg Glu Gly Ser  Ile Tyr Leu Asn Asp  Phe Ala Arg Val Val
                1680                1685                1690

agc agc gac cat gag  gcc gtg aac ggc atc  ctg cac ttc att gac      5145
Ser Ser Asp His Glu  Ala Val Asn Gly Ile  Leu His Phe Ile Asp
                1695                1700                1705

cgt gtc ctg ctg ccc  ccc gag gcg ctg cac  tgg gag cct gat gat      5190
Arg Val Leu Leu Pro  Pro Glu Ala Leu His  Trp Glu Pro Asp Asp
                1710                1715                1720

gct ccc atc ccg agg  aga aat gtc acc gcc  gcc gcc cag ggc ttc      5235
Ala Pro Ile Pro Arg  Arg Asn Val Thr Ala  Ala Ala Gln Gly Phe
                1725                1730                1735

ggt tac aag atc ttc  agc ggc ctc ctg aag  gtg gcc ggc ctc ctg      5280
Gly Tyr Lys Ile Phe  Ser Gly Leu Leu Lys  Val Ala Gly Leu Leu
                1740                1745                1750

ccc ctg ctt cga gag  gca tcc cat agg ccc  ttc aca atg ctg tgg      5325
```

```
Pro Leu Leu Arg Glu  Ala Ser His Arg Pro  Phe Thr Met Leu Trp
                1755                1760                1765

ccc aca gac gcc gcc  ttt cga gct ctg cct  ccg gat cgc cag gcc      5370
Pro Thr Asp Ala Ala  Phe Arg Ala Leu Pro  Pro Asp Arg Gln Ala
                1770                1775                1780

tgg ctg tac cat gag  gac cac cgt gac aag  cta gca gcc att ctg      5415
Trp Leu Tyr His Glu  Asp His Arg Asp Lys  Leu Ala Ala Ile Leu
                1785                1790                1795

cgg ggc cac atg att  cgc aat gtc gag gcc  ttg gca tct gac ctg      5460
Arg Gly His Met Ile  Arg Asn Val Glu Ala  Leu Ala Ser Asp Leu
                1800                1805                1810

ccc aac ctg ggc cca  ctt cga acc atg cat  ggg acc ccc atc tct      5505
Pro Asn Leu Gly Pro  Leu Arg Thr Met His  Gly Thr Pro Ile Ser
                1815                1820                1825

ttc tcc tgc agc cga  acg cgg ccc ggt gag  ctc atg gtg ggt gag      5550
Phe Ser Cys Ser Arg  Thr Arg Pro Gly Glu  Leu Met Val Gly Glu
                1830                1835                1840

gat gat gct cgc att  gtg cag cgg cac ttg  ccc ttt gag ggt ggc      5595
Asp Asp Ala Arg Ile  Val Gln Arg His Leu  Pro Phe Glu Gly Gly
                1845                1850                1855

ctg gcc tat ggc atc  gac cag ctg ctg gag  cca cct ggc ctt ggt      5640
Leu Ala Tyr Gly Ile  Asp Gln Leu Leu Glu  Pro Pro Gly Leu Gly
                1860                1865                1870

gct cgc tgt gac cac  ttt gag acc cgg ccc  ctg cga ctg aac acc      5685
Ala Arg Cys Asp His  Phe Glu Thr Arg Pro  Leu Arg Leu Asn Thr
                1875                1880                1885

tgc agc atc tgt ggg  ctg gag cca ccc tgt  cct gag ggg tca cag      5730
Cys Ser Ile Cys Gly  Leu Glu Pro Pro Cys  Pro Glu Gly Ser Gln
                1890                1895                1900

gag cag ggc agc cct  gag gcc tgc tgg cgc  ttc tac ccg aag ttc      5775
Glu Gln Gly Ser Pro  Glu Ala Cys Trp Arg  Phe Tyr Pro Lys Phe
                1905                1910                1915

tgg acg tcc cct ccg  ctg cac tct ttg gga  tta cgc agc gtc tgg      5820
Trp Thr Ser Pro Pro  Leu His Ser Leu Gly  Leu Arg Ser Val Trp
                1920                1925                1930

gtc cac ccc agc ctt  tgg ggt agg ccc caa  ggc ctg ggc agg ggc      5865
Val His Pro Ser Leu  Trp Gly Arg Pro Gln  Gly Leu Gly Arg Gly
                1935                1940                1945

tgc cac cgc aat tgt  gtc acc acc acc tgg  aag ccc agc tgc tgc      5910
Cys His Arg Asn Cys  Val Thr Thr Thr Trp  Lys Pro Ser Cys Cys
                1950                1955                1960

cct ggt cac tat ggc  agt gag tgc caa gct  tgc cct ggc ggc ccc      5955
Pro Gly His Tyr Gly  Ser Glu Cys Gln Ala  Cys Pro Gly Gly Pro
                1965                1970                1975

agc agc cct tgt agt  gac cgt ggc gtg tgc  atg gac ggc atg agt      6000
```

```
Ser Ser Pro Cys Ser  Asp Arg Gly Val Cys  Met Asp Gly Met Ser
                1980                1985                1990

ggc agt ggg cag tgt  ctg tgc cgt tca ggt  ttt gct ggg aca gcc      6045
Gly Ser Gly Gln Cys  Leu Cys Arg Ser Gly  Phe Ala Gly Thr Ala
                1995                2000                2005

tgt gaa ctc tgt gct  cct ggt gcc ttt ggg  ccc cat tgt caa gcc      6090
Cys Glu Leu Cys Ala  Pro Gly Ala Phe Gly  Pro His Cys Gln Ala
                2010                2015                2020

tgc cgc tgc act gtg  cat ggc cgc tgt gat  gag ggc ctt ggg ggc      6135
Cys Arg Cys Thr Val  His Gly Arg Cys Asp  Glu Gly Leu Gly Gly
                2025                2030                2035

tct ggc tcc tgc ttc  tgt gat gaa ggc tgg  act ggg cca cgc tgt      6180
Ser Gly Ser Cys Phe  Cys Asp Glu Gly Trp  Thr Gly Pro Arg Cys
                2040                2045                2050

gag gtg caa ctg gag  ctg cag cct gtg tgt  acc cca ccc tgt gca      6225
Glu Val Gln Leu Glu  Leu Gln Pro Val Cys  Thr Pro Pro Cys Ala
                2055                2060                2065

ccc gag gct gtg tgc  cgt gca ggc aac agc  tgt gag tgc agc ctg      6270
Pro Glu Ala Val Cys  Arg Ala Gly Asn Ser  Cys Glu Cys Ser Leu
                2070                2075                2080

ggc tat gaa ggg gat  ggc cgc gtg tgt aca  gtg gca gac ctg tgc      6315
Gly Tyr Glu Gly Asp  Gly Arg Val Cys Thr  Val Ala Asp Leu Cys
                2085                2090                2095

cag gac ggg cat ggt  ggc tgc agt gag cac  gcc aac tgt agc cag      6360
Gln Asp Gly His Gly  Gly Cys Ser Glu His  Ala Asn Cys Ser Gln
                2100                2105                2110

gta gga aca atg gtc  act tgt acc tgc ctg  ccc gac tac gag ggt      6405
Val Gly Thr Met Val  Thr Cys Thr Cys Leu  Pro Asp Tyr Glu Gly
                2115                2120                2125

gat ggc tgg agc tgc  cgg gcc cgc aac ccc  tgc aca gat ggc cac      6450
Asp Gly Trp Ser Cys  Arg Ala Arg Asn Pro  Cys Thr Asp Gly His
                2130                2135                2140

cgc ggg ggc tgc agc  gag cac gcc aac tgc  ttg agc acc ggc ctg      6495
Arg Gly Gly Cys Ser  Glu His Ala Asn Cys  Leu Ser Thr Gly Leu
                2145                2150                2155

aac aca cgg cgc tgt  gag tgc cac gca ggc  tac gta ggc gat gga      6540
Asn Thr Arg Arg Cys  Glu Cys His Ala Gly  Tyr Val Gly Asp Gly
                2160                2165                2170

ctg cag tgt ctg gag  gag tcg gaa cca cct  gtg gac cgc tgc ttg      6585
Leu Gln Cys Leu Glu  Glu Ser Glu Pro Pro  Val Asp Arg Cys Leu
                2175                2180                2185

ggc cag cca ccg ccc  tgc cac tca gat gcc  atg tgc act gac ctg      6630
Gly Gln Pro Pro Pro  Cys His Ser Asp Ala  Met Cys Thr Asp Leu
                2190                2195                2200

cac ttc cag gag aaa  cgg gct ggc gtt ttc  cac ctc cag gcc acc      6675
```

```
His Phe Gln Glu Lys  Arg Ala Gly Val Phe  His Leu Gln Ala Thr
                2205                 2210                 2215

agc ggc cct tat ggt  ctg aac ttt tcg gag  gct gag gcg gca tgc      6720
Ser Gly Pro Tyr Gly  Leu Asn Phe Ser Glu  Ala Glu Ala Ala Cys
                2220                 2225                 2230

gaa gca cag gga gcc  gtc ctt gct tca ttc  cct cag ctc tct gct      6765
Glu Ala Gln Gly Ala  Val Leu Ala Ser Phe  Pro Gln Leu Ser Ala
                2235                 2240                 2245

gcc cag cag ctg ggc  ttc cac ctg tgc ctc  atg ggc tgg ctg gcc      6810
Ala Gln Gln Leu Gly  Phe His Leu Cys Leu  Met Gly Trp Leu Ala
                2250                 2255                 2260

aat ggc tcc act gcc  cac cct gtg gtt ttc  cct gtg gcg gac tgt      6855
Asn Gly Ser Thr Ala  His Pro Val Val Phe  Pro Val Ala Asp Cys
                2265                 2270                 2275

ggc aat ggt cgg gtg  ggc gta gtc agc ctg  ggt gcc cgc aag aac      6900
Gly Asn Gly Arg Val  Gly Val Val Ser Leu  Gly Ala Arg Lys Asn
                2280                 2285                 2290

ctc tca gaa cgc tgg  gat gcc tac tgc ttc  cgt gtg caa gat gtg      6945
Leu Ser Glu Arg Trp  Asp Ala Tyr Cys Phe  Arg Val Gln Asp Val
                2295                 2300                 2305

gcc tgc cga tgc cga  aat ggc ttc gtg ggt  gac ggg atc agc acg      6990
Ala Cys Arg Cys Arg  Asn Gly Phe Val Gly  Asp Gly Ile Ser Thr
                2310                 2315                 2320

tgc aat ggg aag ctg  ctg gat gtg ctg gct  gcc act gcc aac ttc      7035
Cys Asn Gly Lys Leu  Leu Asp Val Leu Ala  Ala Thr Ala Asn Phe
                2325                 2330                 2335

tcc acc ttc tat ggg  atg cta ttg ggc tat  gcc aat gcc acc cag      7080
Ser Thr Phe Tyr Gly  Met Leu Leu Gly Tyr  Ala Asn Ala Thr Gln
                2340                 2345                 2350

cgg ggt ctc gac ttc  ctg gac ttc ctg gat  gat gag ctc acg tat      7125
Arg Gly Leu Asp Phe  Leu Asp Phe Leu Asp  Asp Glu Leu Thr Tyr
                2355                 2360                 2365

aag aca ctc ttc gtc  cct gtc aat gaa ggc  ttt gtg gac aac atg      7170
Lys Thr Leu Phe Val  Pro Val Asn Glu Gly  Phe Val Asp Asn Met
                2370                 2375                 2380

acg ctg agt ggc cca  gac ttg gag ctg cat  gcc tcc aac gcc acc      7215
Thr Leu Ser Gly Pro  Asp Leu Glu Leu His  Ala Ser Asn Ala Thr
                2385                 2390                 2395

ctc cta agt gcc aac  gcc agc cag ggg aag  ttg ctt ccg gcc cac      7260
Leu Leu Ser Ala Asn  Ala Ser Gln Gly Lys  Leu Leu Pro Ala His
                2400                 2405                 2410

tca ggc ctc agc ctc  atc atc agt gac gca  ggc cct gac aac agt      7305
Ser Gly Leu Ser Leu  Ile Ile Ser Asp Ala  Gly Pro Asp Asn Ser
                2415                 2420                 2425

tcc tgg gcc cct gtg  gcc cca ggg aca gtt  gtg gtt agc cgt atc      7350
```

```
Ser Trp Ala Pro Val  Ala Pro Gly Thr Val  Val Val Ser Arg Ile
                2430                2435                2440

att gtg tgg gac atc  atg gcc ttc aat ggc  atc atc cat gct ctg      7395
Ile Val Trp Asp Ile  Met Ala Phe Asn Gly  Ile Ile His Ala Leu
                2445                2450                2455

gcc agc ccc ctc ctg  gca ccc cca cag ccc  cag gca gtg ctg gcg      7440
Ala Ser Pro Leu Leu  Ala Pro Pro Gln Pro  Gln Ala Val Leu Ala
                2460                2465                2470

cct gaa gcc cca cct  gtg gcg gca ggc gtg  ggg gct gtg ctt gcc      7485
Pro Glu Ala Pro Pro  Val Ala Ala Gly Val  Gly Ala Val Leu Ala
                2475                2480                2485

gct gga gca ctg ctt  ggc ttg gtg gcc gga  gct ctc tac ctc cgt      7530
Ala Gly Ala Leu Leu  Gly Leu Val Ala Gly  Ala Leu Tyr Leu Arg
                2490                2495                2500

gcc cga ggc aag ccc  acg ggc ttt ggc ttc  tct gcc ttc cag gcg      7575
Ala Arg Gly Lys Pro  Thr Gly Phe Gly Phe  Ser Ala Phe Gln Ala
                2505                2510                2515

gaa gat gat gct gac  gac gac ttc tca ccg  tgg caa gaa ggg acc      7620
Glu Asp Asp Ala Asp  Asp Asp Phe Ser Pro  Trp Gln Glu Gly Thr
                2520                2525                2530

aac ccc acc ctg gtc  tct gtc ccc aac cct  gtc ttt ggc agc gac      7665
Asn Pro Thr Leu Val  Ser Val Pro Asn Pro  Val Phe Gly Ser Asp
                2535                2540                2545

acc ttt tgt gaa ccc  ttc gat gac tca ctg  ctg gag gag gac ttc      7710
Thr Phe Cys Glu Pro  Phe Asp Asp Ser Leu  Leu Glu Glu Asp Phe
                2550                2555                2560

cct gac acc cag agg  atc ctc aca gtc aag  tgacgaggct ggggctgaaa    7760
Pro Asp Thr Gln Arg  Ile Leu Thr Val Lys
                2565                2570

gcagaagcat gcacagggag gagaccactt ttattgcttg tctgggtgga tggggcagga  7820

ggggctgagg gcctgtccca gacaataaag tgccctcagc ggatgtgggc catgtcacc   7879
```

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente capaz de modular en un individuo el receptor Clever-1 sobre la célula de macrófago de tipo 2 que, además del receptor de manosa, también expresa el receptor Clever-1, para la fabricación de una composición farmacéutica para ser usada en el tratamiento del cáncer para la reducción del tamaño del tumor maligno en un paciente con cáncer que tiene un tumor maligno que comprende las células de macrófago de tipo 2 que, además del receptor de manosa, también expresan el receptor Clever-1, en donde el agente es capaz de contrarrestar la influencia o de disminuir la expresión de la proteína Clever-1, en donde el agente se selecciona del grupo que consiste en los anticuerpos anti-Clever-1 antagonistas, Clever-1 soluble, oligonucleótidos antisentido de Clever-1, ARN pequeño interferente (siRNA) específico de Clever-1 y ribozimas específicas de Clever-1.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el anticuerpo monoclonal es DSM ACC2519 o DSM ACC2520, ambos depositados en DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 21 de agosto de 2001.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer es un sarcoma o un carcinoma, en concreto melanoma o linfoma.

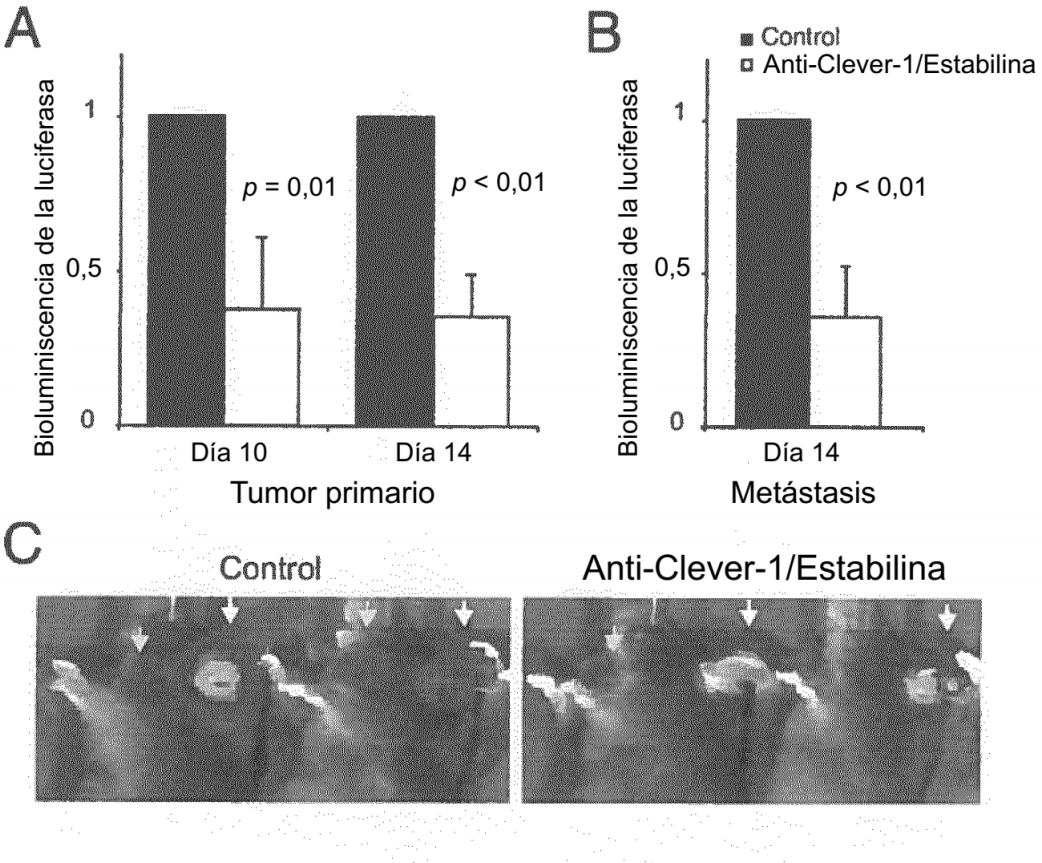
A
Bioluminiscencia de la luciferasa
1
0,5
0
p = 0,01
p < 0,01
Día 10
Día 14
Tumor primario
B
Control
Anti-Clever-1/Estabilina
Bioluminiscencia de la luciferasa
1
0,5
0
p < 0,01
Día 14
Metástasis
C
Control
Anti-Clever-1/Estabilina

FIG. 1A

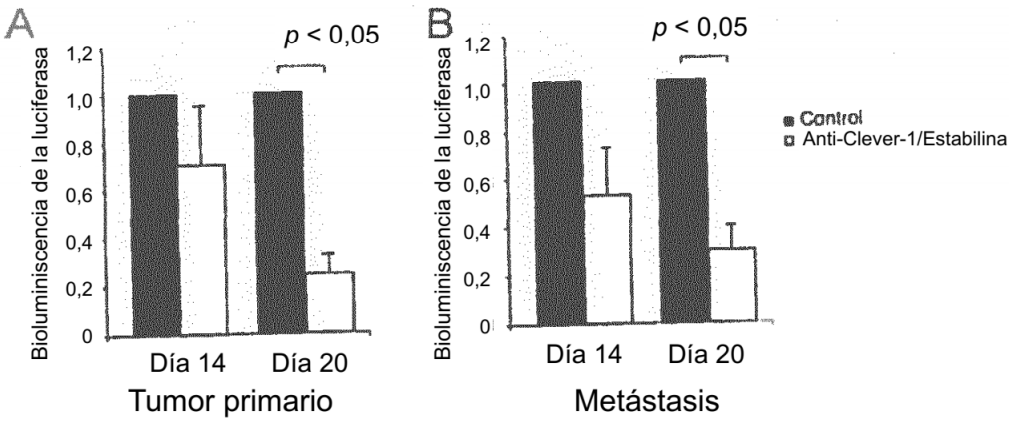
A
Bioluminiscencia de la luciferasa
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
p < 0,05
Día 14
Día 20
Tumor primario
B
Bioluminiscencia de la luciferasa
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
p < 0,05
Control
Anti-Clever-1/Estabilina
Día 14
Día 20
Metástasis

FIG. 1B

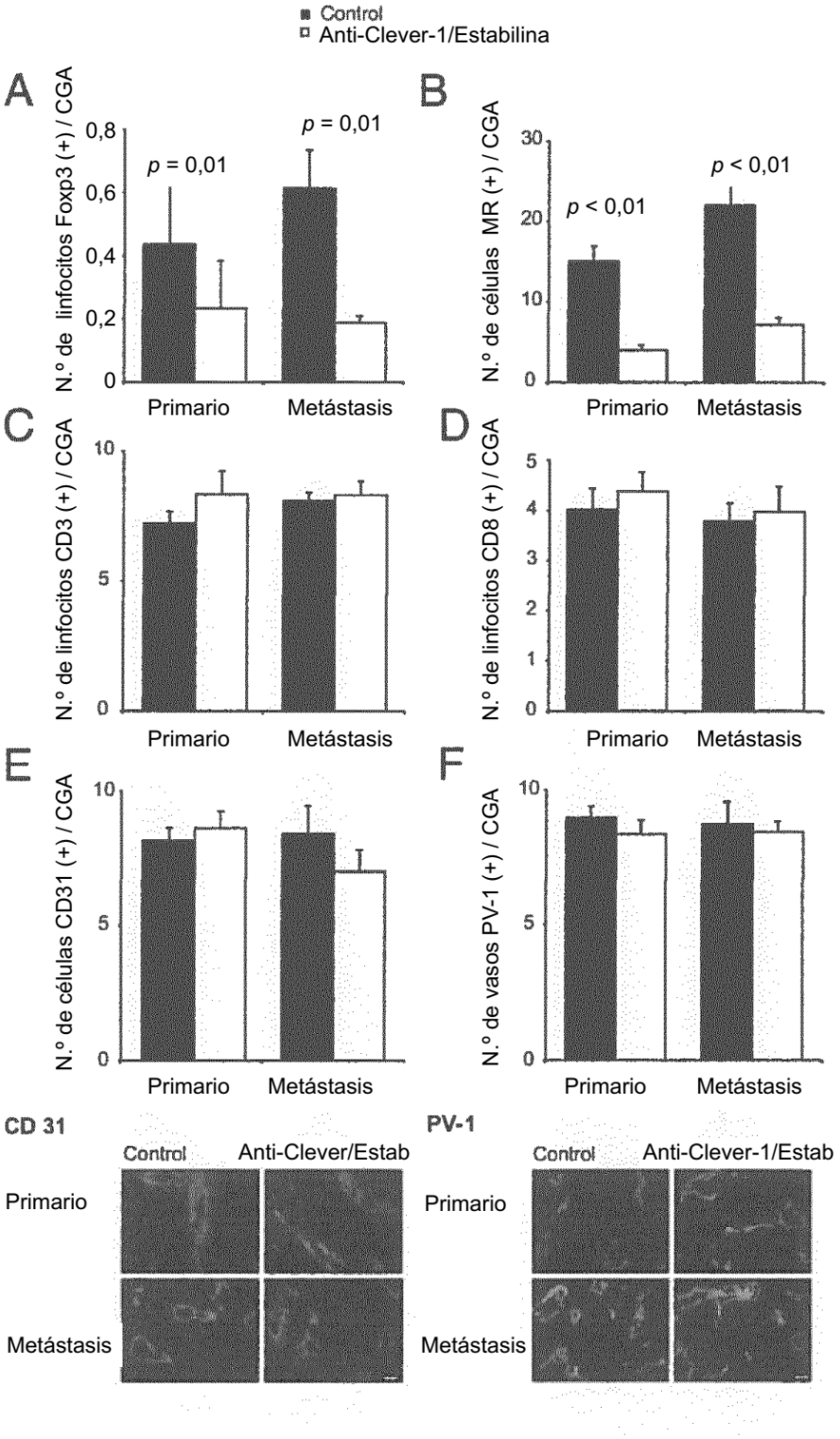
Control
Anti-Clever-1/Estabilina
A
N.º de linfocitos Foxp3 (+) / CGA
0,8
0,6
0,4
0,2
0
p = 0,01
p = 0,01
Primario
Metástasis
B
N.º de células MR (+) / CGA
30
20
10
0
p < 0,01
p < 0,01
Primario
Metástasis
C
N.º de linfocitos CD3 (+) / CGA
10
5
0
Primario
Metástasis
D
N.º de linfocitos CD8 (+) / CGA
5
4
3
2
1
0
Primario
Metástasis
E
N.º de células CD31 (+) / CGA
10
5
0
Primario
Metástasis
F
N.º de vasos PV-1 (+) / CGA
10
5
0
Primario
Metástasis
CD 31
Control
Anti-Clever/Estab
Primario
Metástasis
PV-1
Control
Anti-Clever-1/Estab
Primario
Metástasis

FIG. 2

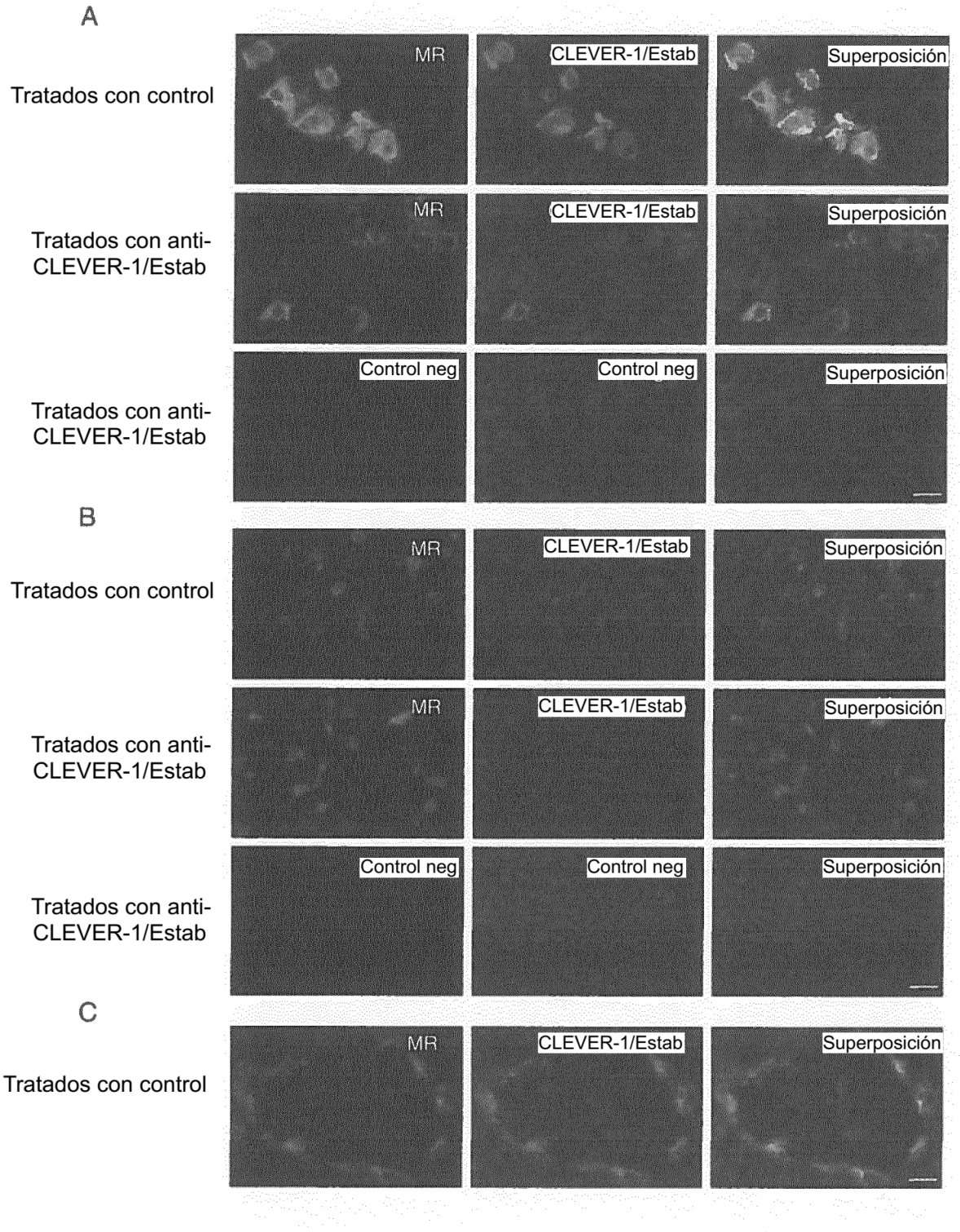
A
Tratados con control
MR
CLEVER-1/Estab
Superposición
Tratados con anti-CLEVER-1/Estab
MR
CLEVER-1/Estab
Superposición
Tratados con anti-CLEVER-1/Estab
Control neg
Control neg
Superposición
B
Tratados con control
MR
CLEVER-1/Estab
Superposición
Tratados con anti-CLEVER-1/Estab
MR
CLEVER-1/Estab
Superposición
Tratados con anti-CLEVER-1/Estab
Control neg
Control neg
Superposición
C
Tratados con control
MR
CLEVER-1/Estab
Superposición

FIG. 3

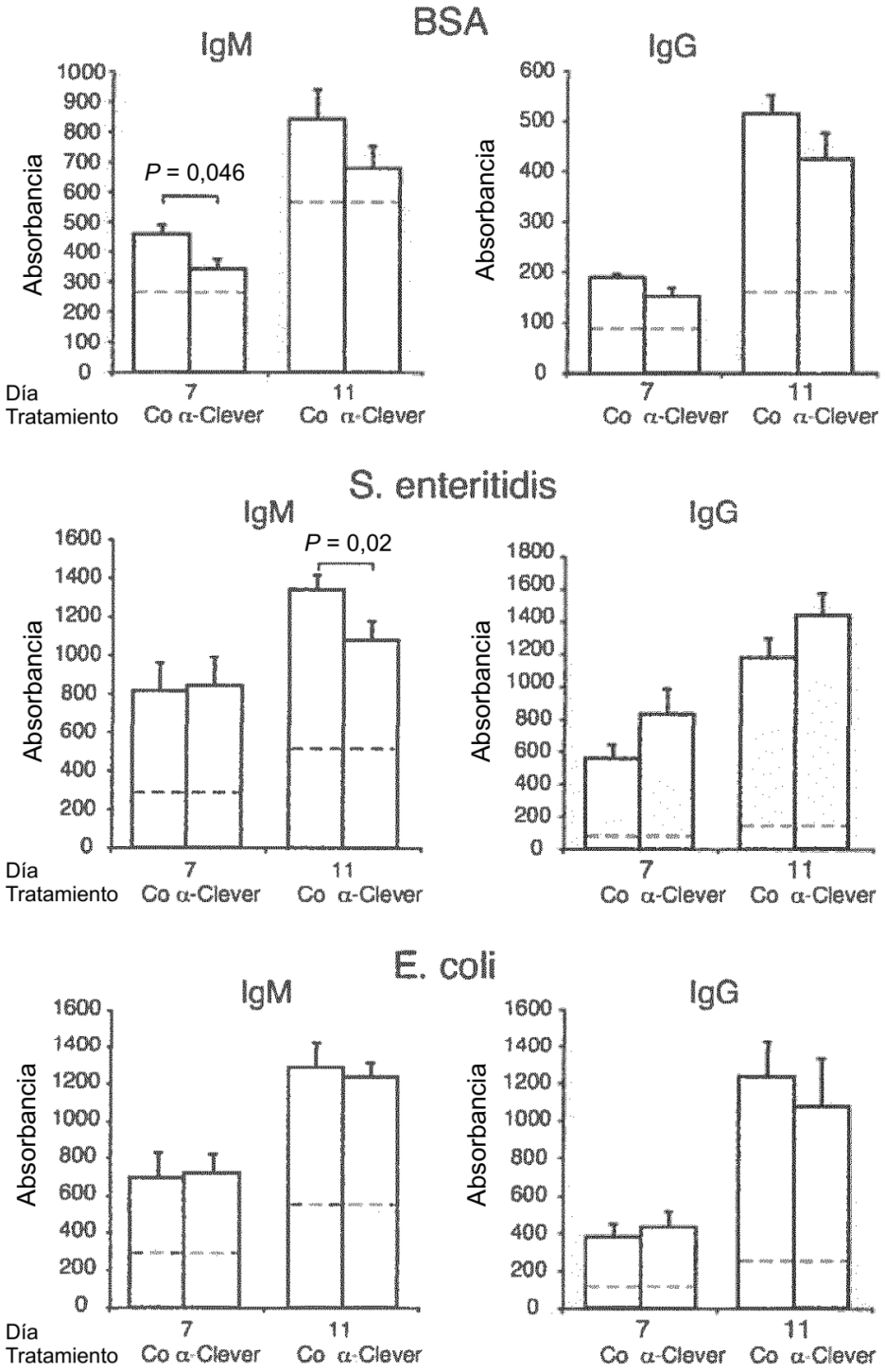
BSA
IgM
IgG
Absorbancia
P = 0,046
Día
Tratamiento
7
11
Co α-Clever
S. enteritidis
P = 0,02
E. coli

FIG. 4

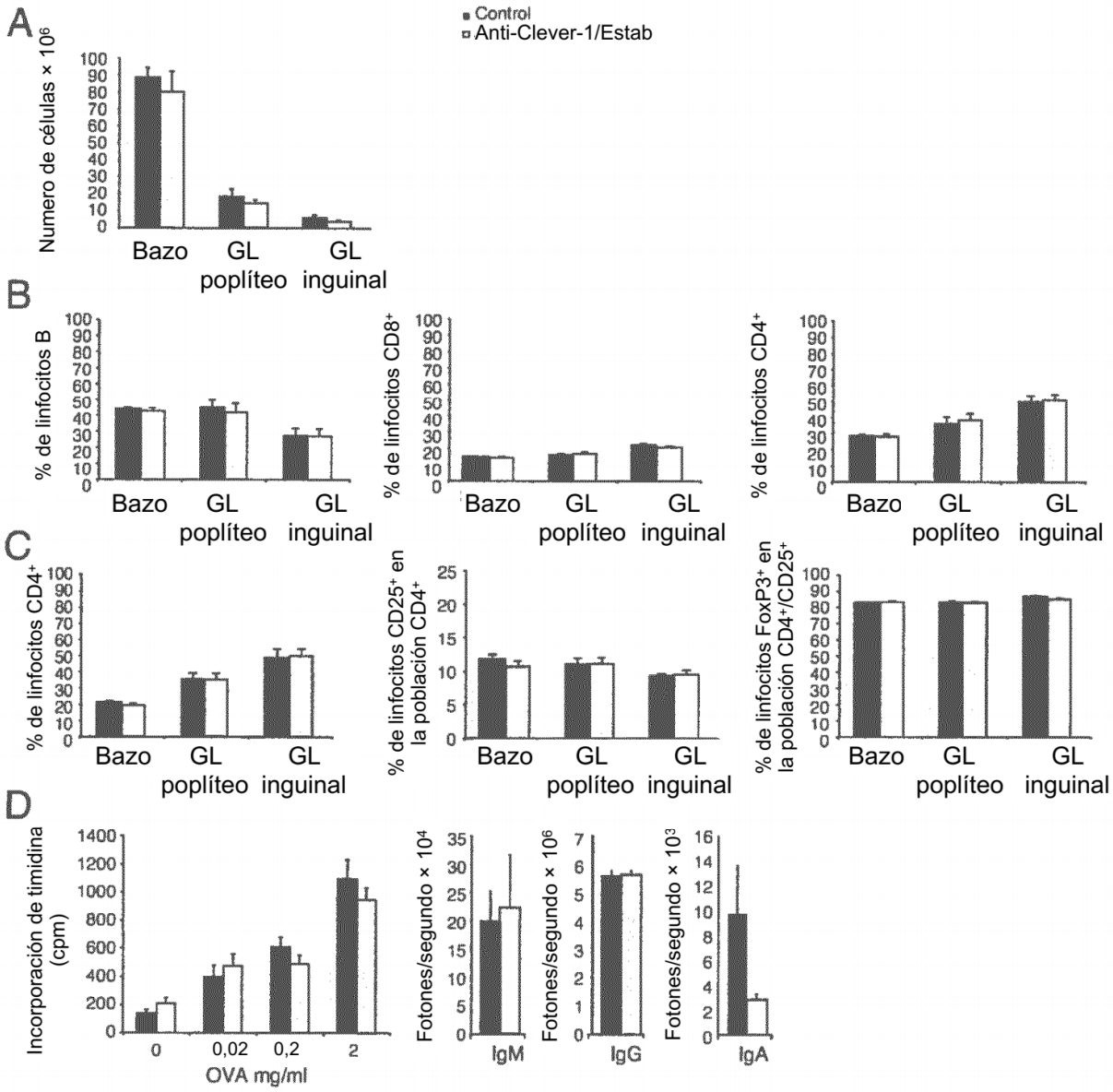
A
Control
Anti-Clever-1/Estab
Numero de células × 10⁶
Bazo
GL poplíteo
GL inguinal
B
% de linfocitos B
% de linfocitos CD8⁺
% de linfocitos CD4⁺
C
% de linfocitos CD4⁺
% de linfocitos CD25⁺ en la población CD4⁺
% de linfocitos FoxP3⁺ en la población CD4⁺/CD25⁺
D
Incorporación de timidina (cpm)
0
0,02
0,2
2
OVA mg/ml
Fotones/segundo × 10⁴
IgM
Fotones/segundo × 10⁶
IgG
Fotones/segundo × 10³
IgA

FIG. 5

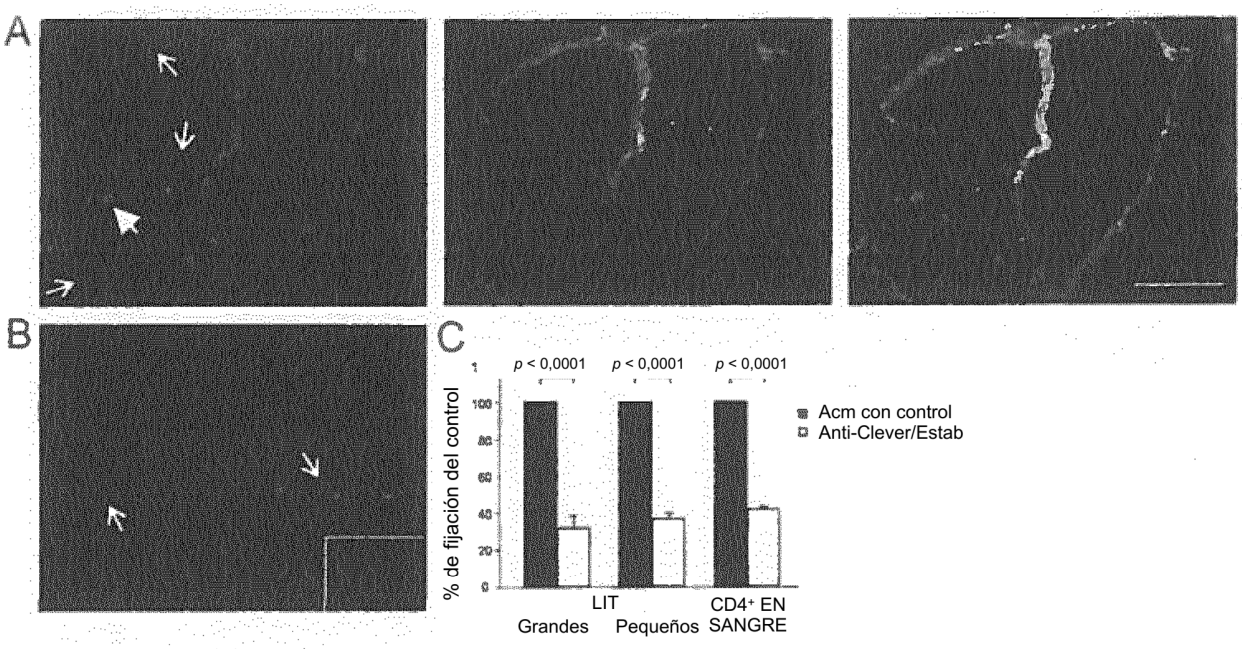
A
B
C
p < 0,0001
p < 0,0001
p < 0,0001
% de fijación del control
100
80
60
40
20
0
Acm con control
Anti-Clever/Estab
LIT
Grandes
Pequeños
CD4+ EN
SANGRE

FIG. 6