

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 486**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2017** **E 21178847 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2024** **EP 3950709**

54 Título: **Métodos para promover la respuesta de linfocitos T**

30 Prioridad:

21.10.2016 EP 16306381
24.07.2017 EP 17305988

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
13.09.2024

73 Titular/es:

OSE IMMUNOTHERAPEUTICS (33.3%)
22, boulevard Benoni Goullin
44200 Nantes, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (33.3%) y
NANTES UNIVERSITÉ (33.3%)

72 Inventor/es:

CHIFFOLEAU, ELISE;
TEPPAZ, GÉRALDINE;
POIRIER, NICOLAS;
VANHOVE, BERNARD y
GAUTIER, VANESSA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la
Oficina Europea de Patentes

ES 2 978 486 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

Métodos para promover la respuesta de linfocitos T

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de CLEC-1 humano para su uso en el tratamiento de cánceres, mediante la promoción de la respuesta de linfocitos T.

10 Antecedentes de la invención

El cáncer es una preocupación importante, ya que es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, que representó 8,2 millones de muertes en 2012 (world cancer report, 2014, Organización Mundial de la Salud). Por ejemplo, el cáncer es la segunda causa de muerte más común en los Estados Unidos, superado solo por las cardiopatías, y representa casi 1 de cada 4 muertes (cancer facts and figures 2015, Sociedad Americana Contra el Cáncer). A pesar de los numerosos tratamientos existentes, sigue siendo necesario un método mejorado para tratar el cáncer.

Las respuestas de linfocitos T representan un elemento clave de las respuestas inmunitarias antitumorales. La respuesta antitumoral de linfocitos T sigue siendo poco conocida, pero varios estudios han mostrado que las respuestas de tipo CD8 citotóxicas y de tipo CD4 auxiliares desempeñan una función clave (Motz, GT y Coukos, G (2013). Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* 39: 61-73) (Bos, R y Sherman, LA (2010). CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res* 70: 8368-8377) (Tosolini, M, *et al.* (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 71: 1263-1271). Por otra parte, los linfocitos Th17 impulsan las respuestas inmunitarias antitumorales al reclutar células inmunitarias en los tumores, activar los linfocitos T CD8+ efectoros o incluso directamente convertirse en el fenotipo Th1 y producir IFN- γ (Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity, Leslie Guéry y Stéphanie Hugues, BioMed Research International, volumen 2015 (2015)).

Entre los enfoques más prometedores para activar la inmunidad terapéutica antitumoral se encuentra el bloqueo de los puntos de control inmunitarios. Los puntos de control inmunitarios se refieren a una plétora de vías inhibitorias integradas en el sistema inmunitario que son cruciales para mantener la autotolerancia y minimizar el daño tisular colateral. Ahora está claro que los tumores captan determinadas vías de puntos de control inmunitarios, en particular a través de las células mieloides, como un mecanismo principal de resistencia inmunitaria (Couzin-Frankel 2013; De Henau, Rausch *et al.* 2016).

En los últimos años, las pruebas acumuladas demuestran que los tumores usan procesos fisiológicos de los receptores inhibidores de lectina de tipo C (CLR), particularmente los implicados en la cicatrización de heridas, para suprimir la activación de células mieloides y promover la evasión inmunitaria. Los CLR tienen la particularidad de reconocer la glucosilación anómala por las células tumorales, pero también ligandos más diversos tales como lípidos, proteínas o DAMP liberados por células moribundas (Geijtenbeek y Gringhuis 2009; Yan, Kamiya *et al.* 2015). Varios estudios experimentales demuestran que los CLR contribuyen a la progresión del cáncer y su diseminación metastásica por su función en la adhesión celular o en la conformación de la respuesta de linfocitos T (Yan, Kamiya *et al.* 2015; Ding, Yao *et al.* 2017). Por ejemplo, se ha mostrado que los receptores inmunomoduladores DC-SIGN, MINCLE, DCIR y BDCA-2 inhiben la activación de las células mieloides, inflamación y son fundamentales para impulsar la expansión de Treg Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ (Yan, Kamiya *et al.* 2015; Ding, Yao *et al.* 2017). DC-SIGN reconoce el antígeno carcinoembrionario sobreexpresado en casi todos los carcinomas humanos (Nonaka, Ma *et al.* 2008) y promueve la secreción de las citocinas inmunosupresoras IL-10 e IL-6 por las células mieloides. Además, se descubrió que los polimorfismos en el promotor del gen DC-SIGN estaban asociados con un mayor riesgo en pacientes con cáncer colorrectal (Lu, Bevier *et al.* 2013). Se mostró que MINCLE mejora en los leucocitos infiltrantes de tumores en el adenocarcinoma ductal pancreático y especialmente por las células supresoras mieloides (MSC). El ligamiento de MINCLE con SAP130 (una subunidad del complejo de histona desacetilasa) liberado de células moribundas induce una fuerte supresión peritumoral (Seifert, Werba *et al.* 2016). De manera similar, se ha mostrado que el CLR LOX-1 se mejora específicamente en la superficie celular de la sangre o en los neutrófilos infiltrantes de tumores (de 15 a 50 %) en pacientes con cáncer, mientras que es casi indetectable en la sangre de donantes sanos (Condamine, Dominguez *et al.* 2016). En este estudio, mostraron que la tensión del retículo endoplásmico induce la expresión de LOX-1 y convierte los neutrófilos en MSC con una fuerte función supresora.

Por el contrario, se ha mostrado que el desencadenamiento de la señalización de CLR de activación, tal como DECTIN-1, activa la inmunidad antitumoral y disminuye los Treg y CMM (Tian, Ma *et al.* 2013). La administración de beta-glucanos, un ligando de DECTIN-1 inhibe el crecimiento tumoral en modelos de carcinoma murino (Li, Cai *et al.* 2010; Masuda, Inoue *et al.* 2013; Tian, Mamá *et al.* 2013), en modelos de xenoinjerto de melanoma, neuroblastoma, linfoma humanos (Modak, Koehne *et al.* 2005), así como en el cáncer de ovario y gástrico humano (Inoue, Tanaka *et al.* 1993; Oba, Kobayashi *et al.* 2009).

Por lo tanto, dirigirse a los CLR inhibidores que se inducen particularmente en este microambiente representa una estrategia terapéutica prometedora para mejorar la activación de las células mieloides y la inmunidad antitumoral.

En el pasado, los inventores identificaron que el receptor 1 similares a la lectina de tipo C (CLEC-1) estaba regulado positivamente en un modelo de tolerancia al aloinjerto en roedores (Thebault, Lhermite *et al.* 2009). CLEC-1 pertenece al grupo de DECTIN-1 de receptores similares a la lectina de tipo C (Plato, Willment *et al.* 2013) y, aunque se identificaron hace mucho tiempo, los ligandos y la señalización siguen sin estar caracterizados. CLEC-1 pertenece al grupo de DECTIN-1 de los CTLR, que incluye CLEC-2, DECTIN-1, CLEC-9A, MICAL, MAH y LOX-1 y, aunque se identificaron hace mucho tiempo (Colonna M, Samaridis J, Angman L. Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2000; 30 (2): 697-704), los ligandos, la señalización corriente abajo y los efectos biológicos siguen sin estar caracterizados. CLEC-1 no contiene un motivo activador (ITAM) o inhibidor (ITIM) de inmunorreceptores basado en tirosina en la cola citoplásmica, sino un resto de tirosina en una secuencia de señalización sin caracterizar (Flornes LM, Nylenna O, Saether PC, Daws MR, Dissen E, Fossum S. The complete inventory of receptors encoded by the rat natural killer cell gene complex. *Immunogenetics.* 2010; 62 (8): 521-530). Sin embargo, se desconoce si este motivo está sujeto a fosforilación o si CLEC-1 requiere, como para otros CTLR, una cadena adaptadora para una expresión y señalización estables. CLEC-1 contiene también como Dectin-1, DC-SIGN o CLEC-2 un motivo triácido [DDD]. Curiosamente, se ha mostrado que este motivo triácido para Dectin-1 modula la actividad de Raf-1 y reprime la vía de NF- κ B dependiente de la proteína 9 que contiene el dominio de reclutamiento de caspasa (Card9) inducida por la mayoría de los CTLR para reprogramar el conjunto de citocinas secretadas y el equilibrio de la posterior diferenciación celular Th1 y Th17 (Gringhuis SI, den Dunn J, Litjens M, *et al.* Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF- κ B activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol.* 2009; 10 (2): 203-213). Hasta ahora se ha descrito muy poco sobre la expresión, regulación y función de la proteína CLEC-1 humana. Solo hay una publicación acerca de la expresión de CLEC-1 que desvela que el CLEC-1 humano solo podría detectarse intracelularmente en células endoteliales con un patrón de tinción que se asemeja a las proteínas del retículo endoplásmico y que ni el TGF- β ni los estímulos inflamatorios podrían promover una translocación significativa a la superficie celular (The human C-type lectin-like receptor CLEC-1 is upregulated by TGF- β and primarily localized in the endoplasmic membrane compartment. Sattler *et al.*, *ScandJ Immunol.* marzo de 2012; 75 (3): 282-92). Por tanto, la única información disponible en el estado de la técnica sobre hCLEC-1 (es decir, la localización intracelular en células endoteliales) es contraria a lo que se conocía en la rata (es decir, rCLEC-1 localizado en la superficie de células endoteliales y mieloides).

Los presentes inventores mostraron por primera vez que CLEC-1 es expresado en la superficie celular por CD convencionales (CDc) y por pequeños subconjuntos de monocitos y CD en sangre humana y es potenciado por la citocina inmunosupresora TGF β . Demostraron tanto en roedores como en seres humanos que CLEC-1 actúa como un receptor inhibitor en las células mieloides y previene la expresión de IL12p40 y respuestas corriente abajo de Th1 y Th17 *in vivo*.

También mostraron que la proliferación de linfocitos T humanos y el IFN-gamma humano aumentan usando anticuerpos anti-hCLEC-1 como antagonistas de CLEC-1. También demostraron que los ratones deficientes en CLEC-1 son más resistentes al crecimiento tumoral y presentan una mayor tasa de supervivencia en un modelo de hepatocarcinoma en ratones. Los inventores mostraron que el CLEC-1 humano es expresado por macrófagos protumorales de tipo M2, por células mieloides del mesotelioma de derrame pleural y de la ascitis de los tumores de ovario. Por lo tanto, CLEC-1 como receptor de superficie celular puede representar una herramienta terapéutica útil para mejorar la inmunidad antitumoral en un entorno clínico.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de CLEC-1 humano para su uso en el tratamiento de cánceres, mediante la promoción de la respuesta de linfocitos T. En particular, la invención se define por las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente, los inventores examinaron la expresión y función de CLEC-1 en **CD humanas y demostraron por primera vez una expresión en la superficie celular**. Los inventores también mostraron en seres humanos que el h-CLEC-1 es expresado por macrófagos protumorales de tipo M2, por células mieloides del mesotelioma de derrame pleural y de la ascitis de los tumores de ovario. Investigaron su papel funcional después de desencadenar la orquestación de las respuestas de linfocitos T.

Además, investigaron *in vitro* e *in vivo* con ratas deficientes en CLEC-1 y proteína de fusión CLEC-1 Fc de rata, la consecuencia de la interrupción de la señalización de CLEC-1 en la función de CD y la inmunidad de linfocitos T corriente abajo. La interrupción de la señalización de CLEC-1 mejora la activación de Th17 *in vitro* e ***in vivo* mejora la sensibilización de los linfocitos T y la activación de Th17 y Th1**. Sus resultados indican claramente que CLEC-1 en las CD inhibe el grado y la calidad de la activación de los linfocitos Th17 y Th1 corriente abajo y, como receptor de la superficie celular, puede proporcionar una herramienta terapéutica para manipular la respuesta de los linfocitos T. **Los inventores también mostraron que la proliferación de linfocitos T humanos y el IFN-gamma humano aumentan usando anticuerpos anti-hCLEC-1 como antagonistas de CLEC-1**. También demostraron que los ratones deficientes en CLEC-1 son más resistentes al crecimiento tumoral y presentan una mayor tasa de supervivencia en un modelo de hepatocarcinoma en ratones. Los resultados muestran que CLEC-1 desempeña el papel de receptor inhibitor en células mieloides elevando el umbral de activación. La inactivación de CLEC-1 aumenta

la proliferación de linfocitos T y la polarización tanto de Th1 como de Th17.

Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de CLEC-1 humano para su uso en el tratamiento de cánceres, mediante la promoción de la respuesta de linfocitos T en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de CLEC-1.

El uso según la invención es para tratar a un sujeto que padece cáncer.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición, en particular una composición farmacéutica, que comprende el antagonista de CLEC-1 de la invención.

Como se usa en el presente documento, la expresión "células T" tiene su significado general en la técnica y se refiere a linfocitos T, que es un tipo de linfocitos que tiene un receptor de linfocitos T en la superficie celular y que desempeña una función central en la inmunidad mediada por células.

Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta de linfocitos T" se refiere a cualquier proceso biológico que implique la proliferación de linfocitos T y/o la síntesis de citocinas.

La respuesta de linfocitos T se puede determinar mediante diversos métodos bien conocidos por un experto en la técnica mediante la evaluación de la proliferación de linfocitos T y/o la síntesis de citocinas. En una realización, la respuesta de linfocitos T se determina realizando una reacción mixta de leucocitos (RML) que consta de linfocitos T purificados aislados de sangre periférica mezclados con células dendríticas derivadas de monocitos alogénicos que expresan CLEC-1. La proliferación de linfocitos T puede evaluarse mediante dilución de éster succinimidílico de carboxifluoresceína y la expresión de IFN γ puede evaluarse mediante citometría de flujo en linfocitos T y mediante ELISA en sobrenadantes.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferentemente, un sujeto según la invención es un ser humano.

El término "cáncer" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un grupo de enfermedades que implican un crecimiento celular anómalo con el potencial de invadir o diseminarse a otras partes del cuerpo. El término "cáncer" abarca además cánceres tanto primarios como metastásicos. Los ejemplos de tipos de cáncer que pueden tratarse mediante métodos y composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación, células cancerosas de la vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mama, colon, esófago, gastrointestinales, encía, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, testículo, lengua o útero. Además, el cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no se limita a estos: neoplasia, maligno; carcinoma; carcinoma, indiferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiformes; carcinoma microcítico; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfoepitelial; carcinoma de células basales; carcinoma pilomatricial; carcinoma de células transicionales; carcinoma papilar de células transicionales; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoideo quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis familiar del colon; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma bronquioloalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma cortical suprarrenal; carcinoma endometriode; carcinoma de anejos cutáneos; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; ceruminoso adenocarcinoma; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma papilar seroso; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en forma de anillo de sello; carcinoma ductal infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor del estroma ovárico, maligno; tecoma, maligno; tumor de células de la granulosa, maligno; y roblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de lipocitos, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanico; melanoma de diseminación superficial; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; liomiosarcoma; rabdomiosarcoma; rabdomiosarcoma embrionario; rabdomiosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mixto mulleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filoides, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma, maligno; bocio ovárico, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor óseo de células gigantes; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; ameloblasticodontosarcoma; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma, maligno;ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplásmico; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico

- primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma, maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma, maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, pequeño linfocítico; linfoma maligno, de células grandes, difuso; linfoma maligno, folicular; micosis fungoide; otros linfomas no hodgkinianos especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfóide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfoma; leucemia mieloide; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; y tricoleucemia.
- En algunas realizaciones, el sujeto padece un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de cerebro y del sistema nervioso central, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino de la enfermedad de Castleman, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe e hipofaringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma, plasmacitoma, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de la cavidad oral y orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de hipófisis, cáncer de próstata, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándula salival, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de vagina, cáncer de vulva y cáncer de útero.
- En una realización, el cáncer es cáncer de hígado.
- En una realización, el cáncer es hepatocarcinoma.
- En una realización, el cáncer es cáncer de ovario.
- En una realización, el cáncer es glioma.
- Como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados incluyendo resultados clínicos. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: aliviar uno o más síntomas que resultan de la enfermedad, disminuir el alcance de la enfermedad, estabilizar la enfermedad (p. ej., prevenir o retardar el empeoramiento de la enfermedad), prevenir o retardar la diseminación de la enfermedad, prevenir o retardar la recidiva de la enfermedad, retardar o ralentizar la progresión de la enfermedad, mejorar la patología, proporcionar una remisión (parcial o total) de la enfermedad, disminuir la dosis de una o más medicaciones adicionales necesarias para tratar la enfermedad, retardar la progresión de la enfermedad, aumentar la calidad de vida y/o prolongar la supervivencia. El término "tratamiento" abarca el tratamiento profiláctico. Como se usa en el presente documento, el término "prevenir" se refiere a la reducción del riesgo de adquirir o desarrollar una afección determinada.
- Como se usa en el presente documento, el término "CLEC-1" tiene su significado general en la técnica y se refiere al receptor 1 similar a la lectina de tipo C, particularmente, de una especie de mamífero, más particularmente, un CLEC-1 humano. CLEC-1 pertenece al grupo DECTIN-1 de receptores similares a la lectina de tipo C (CTLR), que incluye CLEC-2, DECTIN-1, CLEC-9A, MCL, MAH y LOX-1.
- Preferentemente, la expresión "CLEC-1 humano" se refiere a la proteína de la secuencia de aminoácidos a la que se hace referencia por el número de registro Uniprot Q8NC01 y codificada por el gen CLEC1A al que se hace referencia por el número de registro 51267 NCBI.
- En particular, el antagonista de CLEC-1 es un antagonista de CLEC-1 humano.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "antagonista de CLEC-1" tiene su significado general en la técnica y se refiere a cualquier compuesto, natural o sintético, que bloquee, suprima o reduzca la actividad biológica de CLEC-1. En particular, el antagonista de CLEC-1 inhibe las interacciones entre el receptor CLEC-1 y al menos uno de sus ligandos, más particularmente y todos sus ligandos. Más particularmente, el antagonista de CLEC-1 puede unirse al receptor CLEC-1 o a cualquiera de sus ligandos. El antagonista de CLEC-1 mejora la respuesta de linfocitos T, en particular aumenta la proliferación de linfocitos T y/o la síntesis de citocinas tales como IFN γ .
- Por ejemplo, el antagonista de CLEC-1 se puede identificar mediante el siguiente método que comprende las etapas que consisten en:
- proporcionar una pluralidad de células que expresan CLEC-1 en su superficie;
 - incubar dichas células con un compuesto candidato;
 - determinar si dicho compuesto candidato se une y bloquea, suprime o reduce la actividad biológica de CLEC-1 y, en particular, si dicho candidato promueve la respuesta de linfocitos T;
 - y d) seleccionar el compuesto candidato que se une y bloquea, suprime o reduce la actividad biológica de CLEC-1 y, en particular, promueve la respuesta de linfocitos T.

En algunas realizaciones, el antagonista de CLEC-1 es una molécula orgánica pequeña. La expresión "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas usadas en general en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos, etc.).

Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en tamaño hasta aproximadamente 5000 Da, más en particular hasta 2000 Da y lo más en particular hasta aproximadamente 1000 Da.

En algunas realizaciones, el antagonista de CLEC-1 es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el antagonista de CLEC-1 es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CLEC-1.

Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente a" o "se une específicamente" se refiere a la capacidad de un receptor de antígeno para unirse a un antígeno con una afinidad de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M o más y/o para unirse a un antígeno con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno inespecífico.

La afinidad se puede determinar mediante diversos métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, análisis Biacore, análisis de Blitz y diagrama de Scatchard.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención tiene un valor de KD inferior o igual a 10^{-8} M, preferentemente inferior o igual a 10^{-9} M para CLEC-1, en particular para CLEC-1 humano, más preferentemente inferior o igual a $1 \cdot 10^{-10}$ M, como puede determinarse mediante análisis de biosensor, particularmente por análisis Biacore.

En algunas realizaciones, el antagonista de CLEC-1, en particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención se une específicamente al dominio extracelular de CLEC-1, particularmente de CLEC-1 humano.

En una realización, la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CLEC-1 humano es YYQLSNTGQDTISQMEERLGNTS QELQSLQVQNIKLAGSLQHVAEKLCRELYNKAGAHRCSP CTEQWKWHGDNCYQFYKDSKSWEDCKYFCLSENSTMLKINKQEDLEFAASQSYSEFFYSYW TGLLRPDSGKAWLWMDGTPFTSELFHIIDVTSPRSRDCVAILNGMIFSKDCKELKRCVCERRA GMVKPESLHVPPETLGED (SEQ ID NO: 1).

En una realización, la secuencia de aminoácidos que es reconocida por el antagonista de CLEC-1, en particular por el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención es CERRAGMVKPESLHVPPETLGED (SEQ ID NO: 2).

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo" incluye anticuerpos tanto de origen natural como no natural. Específicamente, "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, recombinantes (incluyendo quiméricos y humanizados), biespecíficos, multiespecíficos y modificados, así como fragmentos de unión a antígeno monovalentes y divalentes de los mismos. Asimismo, "anticuerpo" incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente sintéticos, anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o no humano. Un anticuerpo no humano puede humanizarse por métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el hombre.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo modificado" corresponde a una molécula que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo está asociado con una molécula funcionalmente diferente.

En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descritos en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descritos en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano completo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descritos en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descritos en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descritos en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descritos en el presente documento, la parte del anticuerpo comprende una cadena ligera del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descritos en el presente documento, la parte del anticuerpo comprende una cadena pesada del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descritos en el presente documento, la parte del anticuerpo comprende una parte Fab del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descritos en el presente documento, la parte del anticuerpo comprende una parte F(ab')₂ del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descritos en el presente documento, la parte del anticuerpo comprende una parte Fc del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descritos en el presente documento, la parte del anticuerpo comprende una parte Fv del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descritos en el presente documento, la parte del anticuerpo comprende un

dominio variable del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o partes de los mismos descritos en el presente documento, la parte del anticuerpo comprende uno o más dominios CDR del anticuerpo.

Los anticuerpos se preparan según la metodología convencional. Se pueden generar anticuerpos monoclonales usando el método de Kohler y Milstein (Nature, 256: 495, 1975). Para preparar anticuerpos monoclonales útiles en la invención, se inmuniza un ratón u otro animal hospedador apropiado a intervalos adecuados (p. ej., dos veces por semana, semanalmente, dos veces al mes o mensualmente) con formas antigénicas de CLEC-1. Al animal se le puede administrar un "refuerzo" final de antígeno en un periodo de una semana antes del sacrificio. Con frecuencia es deseable usar un adyuvante inmunológico durante la inmunización. Los adyuvantes inmunológicos adecuados incluyen el adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, alumbre, adyuvante de Ribi, Titermax de Hunter, adyuvantes de saponina tales como QS21 o Quil A, u oligonucleótidos inmunoestimulantes que contienen CpG. Otros adyuvantes adecuados son bien conocidos en el campo. Los animales pueden inmunizarse por vías subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intranasal u otras. Un animal dado puede inmunizarse con múltiples formas del antígeno por múltiples vías. En resumen, el CLEC-1 recombinante se puede proporcionar mediante expresión con líneas celulares recombinantes. En particular, el CLEC-1 se puede proporcionar en forma de células humanas que expresan CLEC-1 en su superficie. Tras el régimen de inmunización, los linfocitos se aíslan del bazo, ganglio linfático u otro órgano del animal y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando un agente tal como polietilenglicol para formar un hibridoma. Después de la fusión, las células se colocan en medios permisivos para el crecimiento de hibridomas pero no los compañeros de fusión usando métodos convencionales, como se ha descrito (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3ª edición, Academic Press, Nueva York, 1996). Tras el cultivo de los hibridomas, los sobrenadantes celulares se analizan para determinar la presencia de anticuerpos de la especificidad deseada, es decir, que se unen selectivamente al antígeno. Las técnicas analíticas adecuadas incluyen ELISA, citometría de flujo, inmunoprecipitación y transferencia de Western. Otras técnicas de cribado son bien conocidas en el campo. Son técnicas preferidas las que confirman la unión de anticuerpos a antígeno plegado de forma nativa, conformacionalmente intacto, tal como ELISA no desnaturalizante, citometría de flujo e inmunoprecipitación.

En una realización, el antagonista de CLEC-1 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos monoclonales completamente humanos.

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo quimérico, particularmente un anticuerpo quimérico de ratón/humano. Según la invención, la expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo no humano, y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, en particular un anticuerpo monoclonal humanizado. Como se usa en el presente documento, "humanizado" describe anticuerpos emitidos a partir de especies no humanas cuyas secuencias proteicas se han modificado para incrementar su identidad con las variantes de anticuerpos producidas de forma natural en seres humanos. Por consiguiente, habiéndose obtenido originalmente en animales, especialmente en roedores y en particular en ratas, tras la inmunización de animales y la producción de anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales de hibridoma, los anticuerpos se modifican después en sus secuencias de VH y/o VL mediante sustitución de restos de aminoácidos, en el marco conservado y opcionalmente además en las secuencias de CDR para obtener anticuerpos humanizados. Particularmente, dicho anticuerpo humanizado tiene menos del 10 % de restos de aminoácidos mutados, preferentemente uno o ningún resto de aminoácido mutado, en regiones CDR consideradas individualmente con respecto a las regiones CDR originales. Los métodos de humanización incluyen, pero sin limitación, los descritos en las patentes de los Estados Unidos n.º 4 816 567, 5 225 539, 5 585 089, 5 693 761, 5 693 762 y 5 859 205.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano, en particular un anticuerpo monoclonal completamente humano. También se pueden preparar anticuerpos monoclonales completamente humanos inmunizando ratones transgénicos para grandes partes de loci de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Véanse, p. ej., las patentes de los Estados Unidos n.º 5 591 669, 5 598 369, 5 545 806, 5 545 807, 6 150 584 y las referencias citadas en las mismas. Estos animales se han modificado genéticamente de manera que exista una supresión funcional en la producción de anticuerpos endógenos (p. ej., murinos). Los animales se modifican adicionalmente para que contengan todo o una parte del locus del gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana, de modo que la inmunización de estos animales dará lugar a la producción de anticuerpos completamente humanos contra el antígeno de interés. Después de la inmunización de estos ratones (p. ej., XenoMouse (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenPharm)), se pueden preparar anticuerpos monoclonales según la tecnología convencional de hibridomas. Estos anticuerpos monoclonales tendrán secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana y, por lo tanto, no provocarán respuestas de anticuerpos humanos antirratón (KAMA) cuando se administren a seres humanos. También existen métodos *in vitro* para producir anticuerpos humanos. Estos incluyen tecnología de presentación en fagos (patentes de los Estados Unidos n.º 5 565 332 y 5 573 905) y estimulación *in vitro* de linfocitos B humanos (patentes de los Estados Unidos n.º 5 229 275 y 5 567 610).

Las diversas moléculas y fragmentos de anticuerpos pueden proceder de cualquiera de las clases de inmunoglobulinas

conocidas habitualmente, incluyendo, pero sin limitación, IgA, IgA secretora, IgE, IgG e IgM. Las subclases de IgG también son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

5 En otra realización, el anticuerpo según la invención es un anticuerpo de dominio único. La expresión "anticuerpo de dominio único" (sdAb) o "VHH" se refiere al dominio variable de cadena pesada individual de anticuerpos del tipo que se puede encontrar en mamíferos camélidos que carecen de forma natural de cadenas ligeras. Dichos VHH también se denominan "nanobody®".

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención no media en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos y, por tanto, no comprende una parte Fc que induzca citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención no conduce, directa o indirectamente, al agotamiento de las células que expresan CLEC-1 (p. ej., no conducen a un 10 %, 20 %, 50 %, 60 % o mayor eliminación o disminución del número de células que expresan CLEC-1). En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención carece de un dominio Fc (p. ej., carece de un dominio CH2 y/o CH3) o comprende un dominio Fc del isotipo IgG2 o IgG4.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas inespecíficas (p. ej., linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Sin desear quedar ligado a ningún mecanismo de acción en particular, estas células citotóxicas que median en la ADCC expresan en general receptores de Fc (FcR).

25 Como se usa en el presente documento, el término "agotamiento", con respecto a las células que expresan CLEC-1, significa un proceso, método o compuesto que puede destruir, eliminar, lisar o inducir dicha destrucción, eliminación o lisis, para influir negativamente en el número de células que expresan CLEC-1 presentes en una muestra o en un sujeto.

30 En una realización, el antagonista de CLEC-1 es un mimético de anticuerpo de unión a antígeno.

Como se usa en este documento, la expresión "mimético de anticuerpo de unión a antígeno" se refiere a proteínas artificiales, péptidos y cualquier compuesto químico con capacidad de unirse a antígenos semejante a la de los anticuerpos.

35 Dichos miméticos comprenden afitinas y anticalinas así como aptámeros (aptámeros peptídicos y aptámeros oligonucleotídicos).

40 En una realización, el antagonista de CLEC-1 es un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos con respecto a reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias oligonucleotídicas u oligopeptídicas con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Dichos ligandos se pueden aislar a través de evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, modificado químicamente con el tiempo, de una secuencia única. Los aptámeros peptídicos consisten en regiones variables de anticuerpos conformacionalmente restringidas presentadas en una plataforma proteica, tal como tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan de bibliotecas combinatorias mediante dos métodos híbridos.

50 En algunas realizaciones, el antagonista de CLEC-1 es un polipéptido.

El término "polipéptido" significa en el presente documento un polímero de aminoácidos que no tiene una longitud específica. Por tanto, los péptidos, oligopéptidos y proteínas se incluyen en la definición de "polipéptido" y estos términos se usan indistintamente a lo largo de la memoria descriptiva, así como en las reivindicaciones. El término "polipéptido" no excluye modificaciones postraduccionales que incluyen, pero sin limitación, fosforilación, acetilación, glucosilación y similares.

60 En una realización, el polipéptido de la invención tiene una longitud comprendida entre 2 y 200 aminoácidos. En una realización, el polipéptido de la invención tiene una longitud comprendida entre 2 y 190, en particular entre 10 y 180, entre 10 y 170, entre 10 y 160, entre 10 y 150, entre 10 y 140, entre 10 y 130, entre 10 y 120, entre 10 y 110 aminoácidos. En una realización, el polipéptido de la invención tiene una longitud comprendida entre 50 y 100 aminoácidos. En una realización, el polipéptido de la invención tiene una longitud de 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos.

65 En una realización particular, el polipéptido es un equivalente funcional de CLEC-1. Como se usa en el presente

documento, un "equivalente funcional" de CLEC-1 es un compuesto que es capaz de unirse al menos a un ligando de CLEC-1, evitando de este modo su interacción con CLEC-1. La expresión "equivalente funcional" incluye fragmentos, mutantes y muteínas de CLEC-1. La expresión "funcionalmente equivalente" incluye, por tanto, cualquier equivalente de CLEC-1 obtenido alterando la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, por una o más supresiones, sustituciones o adiciones de aminoácidos de modo que el análogo de proteína conserve la capacidad de unirse a su ligando. Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, mediante mutación puntual del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos. Los equivalentes funcionales incluyen, pero sin limitación, moléculas que se unen a un ligando de CLEC-1 y comprenden todos o una parte de los dominios extracelulares de CLEC-1 para formar un receptor soluble que es capaz de inmovilizar el ligando de CLEC-1. Por tanto, los equivalentes funcionales incluyen formas solubles de CLEC-1. Una forma soluble adecuada de estas proteínas, o equivalentes funcionales de las mismas, podría comprender, por ejemplo, una forma truncada de la proteína de la que se ha eliminado el dominio transmembrana mediante métodos químicos, proteolíticos o recombinantes. Particularmente, el equivalente funcional que consiste en una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad, más particularmente al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % e incluso más particularmente al menos 99 % de identidad con la proteína correspondiente sobre la longitud completa de la proteína correspondiente. Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína correspondiente" se refiere a la proteína para la que el equivalente funcional de la invención tiene una función similar. Los porcentajes de identidad a los que se hace referencia en la presentación de la presente invención se determinan en función de un alineamiento global de secuencias para comparar, es decir, en una alineación de secuencias sobre su longitud completa, usando, por ejemplo, el algoritmo de Needleman y Wunsch 1970. Esta comparación de secuencias se puede realizar, por ejemplo, usando el programa informático needle usando el parámetro "hueco abierto" igual a 10,0, el parámetro "extensión de hueco" igual a 0,5 y una matriz "BLOSUM 62". Están disponibles programas informáticos tales como needle en el sitio web ebi.ac.uk en todo el mundo, bajo el nombre de "needle". La expresión "un fragmento funcionalmente equivalente" como se usa en el presente documento también puede significar cualquier fragmento o ensamblaje de fragmentos de CLEC-1 que se una a un ligando de CLEC-1. Por consiguiente, la presente invención proporciona un polipéptido, en particular un equivalente funcional, capaz de inhibir la unión de CLEC-1 a al menos un ligando de CLEC-1, polipéptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que corresponde a la secuencia de al menos una parte de un dominio extracelular de CLEC-1, parte que se une a un ligando de CLEC-1. En algunas realizaciones, el polipéptido, en particular el equivalente funcional, corresponde a un dominio extracelular de CLEC-1.

En algunas realizaciones, el equivalente funcional de CLEC-1 se fusiona con un polipéptido heterólogo para formar una proteína de fusión. Como se usa en el presente documento, una "proteína de fusión" comprende todo o parte (normalmente biológicamente activa) de un equivalente funcional de la presente invención unido operativamente a un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido distinto del mismo polipéptido). Dentro de la proteína de fusión, se entiende que la expresión "unido operativamente" indica que el equivalente funcional de la presente invención y el polipéptido heterólogo están fusionados en fase entre sí. El polipéptido heterólogo se puede fusionar al extremo N o C del equivalente funcional de la presente invención.

En algunas realizaciones, el equivalente funcional de CLEC-1 se fusiona con un dominio constante de inmunoglobulina (región Fc) para formar una inmunoadhesina. Las inmunoadhesinas pueden poseer muchas de las valiosas propiedades químicas y biológicas de los anticuerpos humanos. Ya que se pueden construir inmunoadhesinas a partir de una secuencia de proteína humana con una especificidad deseada ligada a una secuencia de dominio constante (Fc) y bisagra de inmunoglobulina humana apropiada, la especificidad de unión de interés se puede lograr usando componentes completamente humanos. Dichas inmunoadhesinas son mínimamente inmunogénicas para el paciente y son seguras para uso crónico o repetido. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de secuencia nativa. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc variante. En otra realización más, la región Fc es una región Fc funcional. Como se usa en el presente documento, la expresión "región Fc" se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, habitualmente se define que la región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde un resto de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo de la misma. La parte de adhesión y la parte de secuencia de inmunoglobulina de la inmunoadhesina pueden estar ligadas por un conector mínimo. La secuencia de inmunoglobulina normalmente, pero no necesariamente, es un dominio constante de inmunoglobulina. El resto de inmunoglobulina en las quimeras de la presente invención se puede obtener de los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD o IgM, pero normalmente IgG1 o IgG4. En algunas realizaciones, el equivalente funcional de CLEC-1 y la parte de secuencia de inmunoglobulina de la inmunoadhesina están ligados por un conector mínimo. Como se usa en el presente documento, el término "conector" se refiere a una secuencia de al menos un aminoácido que liga el polipéptido de la invención y la parte de secuencia de inmunoglobulina. Dicho conector puede ser útil para prevenir impedimentos estéricos. En algunas realizaciones, el conector tiene 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30 restos de aminoácidos. Sin embargo, el límite superior no es crítico, sino que se elige por razones de conveniencia con respecto a, p. ej., la producción biofarmacéutica de dichos polipéptidos. La secuencia conectora puede ser una secuencia de origen natural o una secuencia de origen no natural. Si se usa con fines terapéuticos, el conector normalmente no es inmunogénico en el sujeto al que se administra la inmunoadhesina. Un grupo útil de secuencias conectoras son conectores derivados de la región bisagra de anticuerpos de cadena pesada como se describe en los documentos WO 96/34103 y WO 94/04678. Otros ejemplos son las

secuencias conectoras de polialanina.

Los polipéptidos de la invención se pueden producir mediante cualquier medio adecuado, como resultará evidente para los expertos en la materia. Para producir cantidades suficientes de polipéptidos para su uso de acuerdo con la presente invención, la expresión puede realizarse convenientemente cultivando en condiciones apropiadas células hospedadoras recombinantes que contengan el polipéptido de la invención. En particular, el polipéptido se produce por medios recombinantes, por expresión a partir de una molécula de ácido nucleico codificante. Se conocen bien sistemas de clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de células hospedadoras diferentes. Cuando se expresa en forma recombinante, el polipéptido se genera en particular mediante la expresión de un ácido nucleico codificante en una célula hospedadora. Se puede usar cualquier célula hospedadora, dependiendo de los requisitos individuales de un sistema en particular. Las células hospedadoras adecuadas incluyen células bacterianas de mamíferos, células vegetales, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células renales de crías de hámster y muchas otras. Las bacterias también son hospedadores preferidos para la producción de proteína recombinante, debido a la facilidad con la que se pueden manipular y cultivar las bacterias. Un hospedador bacteriano preferido habitual es *E. coli*.

Los polipéptidos de la invención, fragmentos de los mismos y proteínas de fusión según la invención pueden presentar modificaciones postraduccionales, incluyendo, pero sin limitación, glucosilaciones, (p. ej., glucosilaciones ligadas a N u O), miristilaciones, palmitilaciones, acetilaciones y fosforilaciones (p. ej., serina/treonina o tirosina).

En algunas realizaciones, se contempla que los polipéptidos usados en los métodos terapéuticos de la presente invención puedan modificarse para mejorar su eficacia terapéutica. Dicha modificación de compuestos terapéuticos puede usarse para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo circulatorio o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes se puede disminuir significativamente mediante la combinación con diversos vehículos portadores de fármacos que modifican la biodistribución.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para tratar el cáncer, particularmente mediante la promoción de la respuesta de linfocitos T, en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de CLEC-1.

Por tanto, la presente invención se refiere a un antagonista de CLEC-1 para su uso en el tratamiento del cáncer, particularmente mediante la promoción de la respuesta de linfocitos T.

Por tanto, la presente invención se refiere al uso de un antagonista de CLEC-1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, particularmente mediante la promoción de la respuesta de linfocitos T.

En algunas realizaciones, el antagonista de CLEC-1 de la invención se administra al sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz.

Los términos "administrar" o "administración" se refieren al acto de inyectar o de otro modo suministrar físicamente una sustancia tal como existe fuera del cuerpo (p. ej., antagonista de CLEC-1 de la presente invención) al sujeto, tal como por suministro mucoso, intradérmico, intravenoso, subcutáneo, intramuscular, intraarticular y/o cualquier otro método de suministro físico descrito en el presente documento o conocido en la técnica. Cuando se está tratando una enfermedad, o un síntoma de la misma, la administración de la sustancia se produce normalmente después del inicio de la enfermedad o síntomas de la misma. Cuando se está previniendo una enfermedad, o síntomas de la misma, la administración de la sustancia se produce normalmente antes del inicio de la enfermedad o síntomas de la misma.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente de antagonista de CLEC-1 para su uso en un método para el tratamiento del cáncer con una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico responsable dentro del alcance del buen criterio médico. El nivel de dosis específico terapéuticamente eficaz para cualquier sujeto en particular dependerá de diversos factores, incluyendo la gravedad del cáncer, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el momento de la administración, la vía de administración y la tasa de secreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; y factores similares bien conocidos en la técnica médica. Por ejemplo, dentro de la experiencia de la técnica, se conoce bien iniciar de las dosis del compuesto a niveles inferiores a los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos puede variarse a lo largo de un amplio intervalo de 0,01 a 1000 mg por adulto al día. Normalmente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosis para el sujeto que se vaya a tratar. Un medicamento contiene normalmente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del principio activo, normalmente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del principio activo. Habitualmente, se administra una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosis de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal al día.

Las composiciones según la invención se formulan para administración parenteral, transdérmica, oral, rectal, subcutánea, sublingual, tópica o intranasal.

5 Las formas unitarias de administración adecuadas comprenden formas orales, tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas para administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

10 En una realización, las composiciones, en particular composiciones farmacéuticas, según la invención se formulan para administración parenteral. Las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede inyectarse. Estos pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles, (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de dichas sales) o composiciones secas, especialmente liofilizadas que, tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de las soluciones inyectables.

15 En una realización preferida, las composiciones según la invención se formulan para administración intravenosa. En otra realización, las composiciones según la invención se formulan para administración oral.

20 Normalmente, el principio activo de la presente invención (es decir, el antagonista de CLEC-1) se combina con excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones farmacéuticas.

25 La expresión "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado.

30 Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un sólido no tóxico, relleno semisólido o líquido, diluyente, material encapsulante o adyuvante de formulación de cualquier tipo. El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Puede lograrse absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

40 En algunas realizaciones, el antagonista de CLEC-1 de la presente invención se administra al sujeto en combinación con un segundo principio activo.

Dicho segundo principio activo incluye, pero sin limitación, probióticos y agentes terapéuticos como se describe a continuación.

45 Por tanto, la presente invención se refiere a la combinación de un antagonista de CLEC-1 con un segundo principio activo para su uso en el tratamiento del cáncer.

50 En algunas realizaciones, el antagonista de CLEC-1 de la presente invención se administra al sujeto en combinación con un tratamiento estándar (convencional). Por tanto, la presente invención se refiere a la combinación de un antagonista de CLEC-1 con un tratamiento convencional para su uso en el tratamiento del cáncer.

Como se usa en el presente documento, la expresión "tratamiento estándar o convencional" se refiere a cualquier tratamiento del cáncer (fármaco, radioterapia, etc.) administrado habitualmente a un sujeto que padece cáncer.

55 En algunas realizaciones, el antagonista de CLEC-1 de la presente invención se administra al sujeto en combinación con al menos un agente terapéutico adicional, p. ej., para tratar cánceres. Dicha administración puede ser simultánea, separada o secuencial. Para la administración simultánea, los agentes pueden administrarse como una composición o como composiciones separadas, según sea apropiado. El agente terapéutico adicional es normalmente relevante para el trastorno que se va a tratar. Los agentes terapéuticos ilustrativos incluyen otros anticuerpos antineoplásicos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, inmunógenos antineoplásicos, agentes reguladores de la apoptosis/control del ciclo celular, agentes reguladores hormonales y otros agentes descritos a continuación.

65 En algunas realizaciones, el antagonista de CLEC-1 de la presente invención se usa en combinación con un agente quimioterapéutico, una terapia dirigida contra el cáncer, un agente inmunoterapéutico o radioterapia.

En algunas realizaciones, el antagonista de CLEC-1 de la presente invención se usa en combinación con un agente quimioterapéutico. Por tanto, la presente invención se refiere a la combinación de un antagonista de CLEC-1 con un agente quimioterapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer.

5 La expresión "agente quimioterapéutico" se refiere a compuestos químicos que son eficaces para inhibir el crecimiento tumoral. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aciridinas, tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una
10 camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (p. ej., calicheamicina, especialmente calicheamicina (11 y calicheamicina 211, véase, p. ej., Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33: 183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo de neocarzinostatina y los cromóforos de antibióticos de cromoproteinendiina relacionados), aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caninomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolinodoxorrubicina, 2-pirrolin-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalarnicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina;
25 antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiofanol, mepitiofanol, testolactona; antisuipararrenales tales como aminoglutetimidina, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguaona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; PSK®; razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino;
40 vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-1 1; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como antiestrógenos incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprorelina y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

50 En algunas realizaciones, el antagonista de CLEC-1 de la presente invención se usa en combinación con una terapia dirigida contra el cáncer. Por tanto, la presente invención se refiere a la combinación de un antagonista de CLEC-1 con una terapia dirigida para su uso en el tratamiento del cáncer.

Las terapias dirigidas contra el cáncer son fármacos u otras sustancias que bloquean el crecimiento y la diseminación del cáncer al interferir con moléculas específicas ("dianas moleculares") que están implicadas en el crecimiento, progresión y diseminación del cáncer. Las terapias dirigidas contra el cáncer se denominan en ocasiones "fármacos dirigidos molecularmente", "terapias dirigidas molecularmente", "medicinas de precisión", o nombres similares. En algunas realizaciones, la terapia dirigida consiste en administrar al sujeto un inhibidor de tirosina cinasa. La expresión "inhibidor de tirosina cinasa" se refiere a cualquiera de diversos agentes terapéuticos o fármacos que actúan como inhibidores selectivos o no selectivos de tirosina cinasas receptoras y/o no receptoras. Los inhibidores de tirosina cinasa y compuestos relacionados son bien conocidos en la técnica y se describen en la publicación de patente de los Estados Unidos 2007/0254295. Un experto en la materia apreciará que un compuesto relacionado con un inhibidor de tirosina cinasa recapitulará el efecto del inhibidor de tirosina cinasa, p. ej., el compuesto relacionado actuará sobre un miembro diferente de la vía de señalización de tirosina cinasa para producir el mismo efecto que lo haría un inhibidor de tirosina cinasa de esa tirosina cinasa. Los ejemplos de inhibidores de tirosina cinasa y compuestos relacionados adecuados para su uso en métodos de realizaciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, dasatinib (BMS-354825), PP2, BEZ235, saracatinib, gefitinib (Iressa), sunitinib (Sutent; SU11248), erlotinib (Tarceva; OSI-1774),

lapatinib (GW572016; GW2016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), imatinib (Gleevec; STI571), leflunomida (SU101), vandetanib (Zactima; ZD6474), MK-2206 (clorhidrato de 8-[4-aminociclobutil]fenil]-9-fenil-1,2,4-triazolo[3,4-f][1,6]naftiridin-3(2H)-ona), derivados de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos. Se describen inhibidores adicionales de tirosina cinasa y compuestos relacionados adecuados para su uso en la presente invención en, por ejemplo, la publicación de patente de los Estados Unidos 2007/0254295, patentes de los Estados Unidos n.º 5 618 829, 5 639 757, 5 728 868, 5 804 396, 6 100 254, 6 127 374, 6 245 759, 6 306 874, 6 313 138, 6 316 444, 6 329 380, 6 344 459, 6 420 382, 6 479 512, 6 498 165, 6 544 988, 6 562 818, 6 586 423, 6 586 424, 6 740 665, 6 794 393, 6 875 767, 6 927 293 y 6 958 340. En algunas realizaciones, el inhibidor de tirosina cinasa es un inhibidor de cinasa de molécula pequeña que se ha administrado por vía oral y que ha sido objeto de al menos un ensayo clínico de fase I, más preferentemente al menos un ensayo clínico de fase II, incluso más preferentemente al menos un ensayo clínico de fase III y lo más preferentemente aprobado por la FDA para al menos una indicación hematológica u oncológica. Los ejemplos de dichos inhibidores incluyen, pero sin limitación, gefitinib, erlotinib, lapatinib, canertinib, BMS-599626 (AC-480), neratinib, KRN-633, CEP-11981, imatinib, nilotinib, dasatinib, AZM-475271, CP-724714, TAK-165, sunitinib, vatalanib, CP-547632, vandetanib, bosutinib, lestaurtinib, tandutinib, midostaurina, enzastaurina, AEE-788, pazopanib, axitinib, motasenib, OSI-930, cediranib, KRN-951, dovitinib, seliciclib, SNS-032, PD-0332991, MKC-I (Ro-317453; R-440), sorafenib, ABT-869, brivanib (BMS-582664), SU-14813, telatinib, SU-6668, (TSU-68), L-21649, MLN-8054, AEW-541 y PD-0325901.

En algunas realizaciones, el antagonista de CLEC-1 de la presente invención se usa en combinación con un agente inmunoterapéutico. Por tanto, la presente invención se refiere a la combinación de un antagonista de CLEC-1 con un agente inmunoterapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer.

La expresión "agente inmunoterapéutico", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto, composición o tratamiento que mejora, estimula o aumenta directa o indirectamente la respuesta inmunitaria del cuerpo contra las células cancerosas y/o que disminuye los efectos secundarios de otras terapias antineoplásicas. Por tanto, la inmunoterapia es una terapia que estimula o mejora directa o indirectamente las respuestas del sistema inmunitario a las células cancerosas y/o reduce los efectos secundarios que pueden haber sido causados por otros agentes antineoplásicos. La inmunoterapia también se denomina en la técnica terapia inmunológica, terapia biológica, terapia modificadora de la respuesta biológica y bioterapia. Los ejemplos de agentes inmunoterapéuticos habituales conocidos en la técnica incluyen, pero sin limitación, citocinas, vacunas contra el cáncer, anticuerpos monoclonales y adyuvantes distintos de citocinas. Como alternativa, el tratamiento inmunoterapéutico puede consistir en administrar al sujeto una cantidad de células inmunitarias (linfocitos T, linfocitos NK, células dendríticas, linfocitos B...). Los agentes inmunoterapéuticos pueden ser inespecíficos, es decir, reforzar el sistema inmunitario en general de modo que el cuerpo humano sea más eficaz en la lucha contra el crecimiento y/o la diseminación de células cancerosas, o pueden ser específicos, es decir, dirigidos a las propias células cancerosas, los regímenes de inmunoterapia pueden combinar el uso de agentes inmunoterapéuticos específicos e inespecíficos. Los agentes inmunoterapéuticos inespecíficos son sustancias que estimulan o mejoran indirectamente el sistema inmunitario. Se han usado agentes inmunoterapéuticos inespecíficos solos como terapia principal para el tratamiento del cáncer, así como además de una terapia principal, en cuyo caso el agente inmunoterapéutico inespecífico actúa como adyuvante para mejorar la eficacia de otras terapias (p. ej., vacunas contra el cáncer). Los agentes inmunoterapéuticos inespecíficos también pueden actuar en este último contexto para reducir los efectos secundarios de otras terapias, por ejemplo, supresión de la médula ósea inducida por determinados agentes quimioterapéuticos. Los agentes inmunoterapéuticos inespecíficos pueden actuar sobre células clave del sistema inmunitario y causar respuestas secundarias, tales como el aumento de la producción de citocinas e inmunoglobulinas. Como alternativa, los agentes pueden comprender ellos mismos citocinas. Los agentes inmunoterapéuticos inespecíficos se clasifican en general como citocinas o adyuvantes distintos de citocinas. Varias citocinas han encontrado aplicación en el tratamiento del cáncer como inmunoterapias generales inespecíficas diseñadas para reforzar el sistema inmunitario o como adyuvantes proporcionados con otras terapias. Las citocinas adecuadas incluyen, pero sin limitación, interferones, interleucinas y factores estimulantes de colonias. Los interferones (IFN) contemplados por la presente invención incluyen los tipos habituales de IFN, IFN-alfa (IFN- α), IFN-beta (IFN- β) e IFN-gamma (IFN- γ). Los IFN pueden actuar directamente sobre las células cancerosas, por ejemplo, ralentizando su crecimiento, promoviendo su desarrollo en células con un comportamiento más normal y/o aumentando su producción de antígenos, haciendo de este modo que las células cancerosas sean más fáciles de reconocer y destruir para el sistema inmunitario. Los IFN también pueden actuar indirectamente sobre las células cancerosas, por ejemplo, ralentizando la angiogénesis, reforzando el sistema inmunitario y/o estimulando los linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T y macrófagos. El IFN-alfa recombinante está disponible en el mercado como Roferon (Roche Pharmaceuticals) e Intron A (Schering Corporation). Las interleucinas contempladas por la presente invención incluyen IL-2, IL-4, IL-11 e IL-12. Los ejemplos de interleucinas recombinantes disponibles en el mercado incluyen Proleukin® (IL-2; Chiron Corporation) y Neumega® (IL-12; Wyeth Pharmaceuticals). Zymogenetics, Inc. (Seattle, Wash.) está probando actualmente una forma recombinante de IL-21, que también se contempla para su uso en las combinaciones de la presente invención. Los factores estimulantes de colonias (CSF) contemplados por la presente invención incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF o filgrastim), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF o sargramostim) y eritropoyetina (epoetina alfa, darbepoyetina). El tratamiento con uno o más factores de crecimiento puede ayudar a estimular la generación de nuevas células sanguíneas en sujetos sometidos a quimioterapia tradicional. Por consiguiente, el tratamiento con CSF puede ser útil para disminuir los efectos secundarios asociados con la quimioterapia y puede permitir el uso de dosis más altas de agentes quimioterapéuticos. Están disponibles en el mercado diversos factores estimulantes de colonias

recombinantes, por ejemplo, Neupogen® (G-CSF; Amgen), Neulasta (pelfilgrastim; Amgen), Leukine (GM-CSF; Berlex), Procrit (eritropoyetina; Ortho Biotech), Epogen (eritropoyetina; Amgen), Arnesp (eritropoyetina). Las composiciones combinadas y los métodos de administración combinados de la presente invención también pueden implicar métodos de inmunoterapia de "células completas" y "adoptiva". Por ejemplo, dichos métodos pueden comprender la infusión o reinfusión de células del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), tales como linfocitos T CC2+ y/o CD8+ (por ejemplo, linfocitos T expandidos con antígenos específicos de tumores y/o mejoras genéticas), linfocitos B que expresan anticuerpos u otras células productoras o presentadoras de anticuerpos, células dendríticas (p. ej., células dendríticas cultivadas con un agente de expansión de CD tal como GM-CSF y/o Flt3-L, y/o células dendríticas cargadas con antígenos asociados a tumores), linfocitos NK antitumorales, las denominadas células híbridas o combinaciones de las mismas. Los lisados celulares también pueden ser útiles en dichos métodos y composiciones. Las "vacunas" celulares en ensayos clínicos que pueden ser útiles en dichos aspectos incluyen Canvaxin™, APC-8015 (Dendreon), HSPPC-96 (antigénicos) y lisados de células Melacine®. Los antígenos desprendidos de las células cancerosas y mezclas de los mismos (véase, por ejemplo, Bystryn *et al.*, Clinical Cancer Research Vol. 7, 1882-1887, julio de 2001), opcionalmente mezclados con adyuvantes tales como alumbre, también pueden ser componentes de dichos métodos y composiciones combinadas.

En algunas realizaciones, el antagonista de CLEC-1 de la presente invención se usa en combinación con radioterapia. Por tanto, la presente invención se refiere a la combinación de un antagonista de CLEC-1 con radioterapia para su uso en el tratamiento del cáncer.

La radioterapia puede comprender radiación o la administración asociada de radiofármacos a un paciente. La fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente que se trata (el tratamiento con radiación puede, por ejemplo, ser en forma de radioterapia de haz externo (EBRT) o braquiterapia (BT)). Los elementos radiactivos que pueden usarse en la práctica de dichos métodos incluyen, p. ej., radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yoduro-123, yoduro-131 e indio-111.

En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para cribar un antagonista de CLEC-1 que comprende las etapas que consisten en:

- a) proporcionar una pluralidad de células que expresan CLEC-1 en su superficie;
- b) incubar dichas células con un compuesto candidato;
- c) determinar si dicho compuesto candidato se une y bloquea, suprime o reduce la actividad biológica de CLEC-1 y si dicho candidato promueve la respuesta de linfocitos T;

y d) seleccionar el compuesto candidato que se une y bloquea, suprime o reduce la actividad biológica de CLEC-1 y promueve la respuesta de linfocitos T.

En una realización particular, el método de cribado de la invención puede comprender además una etapa que consiste en administrar el compuesto candidato seleccionado en la etapa d) a un modelo animal para validar los efectos protectores y/o terapéuticos de dicho candidato.

En general, dichos métodos de cribado implican proporcionar células adecuadas que expresan CLEC-1 en su superficie. En particular, se puede emplear un ácido nucleico que codifica CLEC-1 para transfectar células para expresar de este modo el receptor de la invención. Dicha transfección se puede lograr mediante métodos bien conocidos en la técnica.

La presente divulgación también se refiere a un método de preparación de un compuesto usado para tratar el cáncer, comprendiendo dicho método una etapa de identificación del antagonista de CLEC-1 capaz de promover la respuesta de linfocitos T.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Figuras

Figura 1: Expresión y regulación de ARNm y proteína de CLEC-1 en órganos y células humanos.

A) La expresión de ARNm de CLEC-1 se evaluó mediante RT-PCR cuantitativa en leucocitos de sangre periférica (PBL), neutrófilos (neutro), monocitos (mono), células dendríticas derivadas de monocitos (CDmo), células endoteliales aórticas humanas (CEAH), linfocitos T y B.

B) Gráficos de histogramas y puntos representativos del isotipo IgG1 o tinción de CLEC-1 evaluada mediante citometría de flujo en sangre humana i) CD45+ CD14- CD11c+ HLA-DR^{alto} CD, ii) monocitos CD45+ CD14+ iii) neutrófilos SSC^{alto} CD16+ y en iii) CEAH (extracelulares e intracelulares), con mAb anti-hCLEC-1. Gráfico de histograma con la imagen superpuesta de CLEC-1 que coincide con el gráfico de histograma de células teñidas con el isotipo de control IgG1.

C) Expresión de CLEC-1 en CDmo humanas. i) Gráficos de puntos representativos del % de CDmo que expresan CLEC-1 de superficie celular (APC) y HLA-DR (FITC) evaluados mediante citometría de flujo en células sin

estimular (SE) y células estimuladas con LPS (TLR4-L), Poli I:C (TLR3-L), R848 (TLR7-L) y TGF- β como se describe en Material y métodos con mAb anti-hCLEC-1. El isotipo IgG1 se realizó como control. ii) El histograma representa la intensidad de fluorescencia media (IFM) \pm ETM de la tinción de CLEC-1 en 6 experimentos independientes. Se realizó análisis estadístico de la tinción de IFM de CLEC-1 entre células SE y estimuladas.

Figura 2: Efecto del desencadenamiento de CLEC-1 sobre la maduración de CDmo humana y la activación de linfocitos T corriente abajo.

A) Las CDmo humanas incubadas sin nada o con mAb anti-CLEC-1 unido a placa o control de isotipo IgG1 se estimularon de forma alternativa simultáneamente con LPS (1 μ g/ml) durante 24 horas, se recogieron y CD80, CD86, CD83 y HLA-DR se evaluaron mediante citometría de flujo y B), TNF- α , IL-12p70, IL-6, IL-23 e IL-10 se evaluaron en los sobrenadantes mediante ELISA.

C) A continuación, las células se lavaron y se sometieron a RML con linfocitos T alogénicos durante 5 días. La proliferación se evaluó mediante citometría de flujo mediante dilución de CFSE en linfocitos T alogénicos y se evaluaron IL-17 e IFN- γ en el sobrenadante mediante ELISA.

Figura 3: Efecto de la deficiencia de CLEC-1 (ratas CLEC-1 KO) sobre las propiedades de maduración de CDMO de rata, secreción de citocinas y activación de linfocitos T.

Las CDMO se generaron a partir de ratas TS o KO durante 8 días como se describe en Material y métodos, y se incubaron durante 4 días en RML con linfocitos T CD4⁺ purificados alogénicos de ratas sin tratamiento previo. i) Histograma y tinción representativa de la proliferación evaluada en linfocitos T CD4⁺ mediante dilución de CFSE por citometría de flujo y ii) Histograma y gráficos de puntos representativos del porcentaje de células IL-17⁺ e IFN- γ ⁺ entre linfocitos T CD4⁺ seleccionados evaluados por citometría de flujo. Los datos se expresaron en histogramas como media \pm ETM de 4 experimentos independientes.

Figura 4: Efecto del bloqueo de la señalización de CLEC-1 con la proteína de fusión CLEC-1 Fc sobre la activación de linfocitos T mediada por CDMO de rata.

Las CDMO de ratas TS se incubaron durante 4 días en RML con linfocitos T CD4⁺ purificados alogénicos de ratas sin tratamiento previo junto con CLEC-1-Fc o proteínas de fusión hSEAP-Fc irrelevantes (producidas y purificadas en las mismas condiciones) (10 μ g/ml).

i) Se evaluó la proliferación de células Foxp3⁺ y Foxp3⁻ en linfocitos T CD4⁺ mediante dilución de CFSE mediante citometría de flujo y

ii) se evaluaron las producciones de citocinas IL-17 e IFN- γ en los sobrenadantes de RML mediante ELISA. Los datos se expresaron en histogramas como media \pm ETM de 4 experimentos independientes.

Figura 5: Efecto de la deficiencia de CLEC-1 (ratas CLEC-1 KO) en sensibilización de linfocitos T CD4⁺ *in vivo* mediada por CD y destino de polarización Th.

A) La expresión de ARNm de CLEC-1 se evaluó mediante RT-PCR cuantitativa en diferentes subtipos celulares de CD CD103⁺ CD4⁻ (con presentación cruzada) y CD4⁺ (sin presentación cruzada) convencionales de rata de órganos linfoides secundarios (OLS) (n = 5, *p < 0,05).

B) Se inmunizaron por vía subcutánea ratas TS y CLEC-1 KO en la almohadilla plantar con CFA más proteína KLH (100 μ g/ml). El día 10 después de la inmunización, los ganglios linfáticos poplíteos se recogieron y cultivaron en presencia de KLH u OVA de control (25 μ g/ml) durante 3 días. Histogramas y gráficos representativos de i) Proliferación en T CD4⁺ evaluada por dilución de CFSE y ii) proporción de células IL-17⁺, IL-17⁺ IFN- γ ⁺ e IFN- γ ⁺ entre linfocitos T CD4⁺ seleccionados evaluados por citometría de flujo. Los datos se expresaron en histogramas como media \pm ETM de 4 experimentos independientes.

Figura 6: Efecto del antagonista potencial de CLEC-1 sobre la activación de RML (CDmo+ alo T).

RML consistió en linfocitos T purificados aislados de sangre periférica (5X10⁴) mezclada con células dendríticas derivadas de monocitos alogénicos (12,5X10³) que expresan un alto nivel de CLEC-1. Se añadieron control de isotipo (IgG1) o anticuerpo anti-CLEC-1 humano a dosis de 0,5 a 10 μ g/ml durante 5 días. A continuación, se evaluó la proliferación de linfocitos T mediante dilución de éster succinimidílico de carboxifluoresceína y se evaluó la expresión de IFN- γ mediante citometría de flujo en linfocitos T y mediante ELISA en sobrenadantes (figuras 6A, B y C, histogramas y gráficos representativos).

Figura 7: CLEC-1 de punto de control inhibitor en cáncer (prueba de concepto en roedor).

a) Expresión rápida y duradera de CLEC-1 en tumores sólidos en roedores (células tumorales de hepatocarcinoma hepa 1.6 inyectadas por vía intraportal en el hígado de ratones b6, la expresión de *Clec1a* se evaluó mediante Q-PCR).

b) Los roedores deficientes en CLEC-1 luchan mejor contra el tumor que los ratones de tipo silvestre: células tumorales de hepatocarcinoma hepa 1.6 inyectadas por vía intraportal en el hígado de ratones b6 TS o deficientes en *Clec1a*, los datos se expresan en % de supervivencia de ratones Prueba de Wilcoxon ***p < 0,001

c) ratas: Se inyectaron por vía subcutánea células de glioma C6 (1 millón) en el flanco de ratas Sprague Dawley (spd) TS o deficientes en *Clec1a* y se supervisó el volumen tumoral hasta d35.

d) Se inyectaron por vía subcutánea células de glioma C6 (1 millón) en el flanco de ratas Sprague Dawley (spd) TS o deficientes en *Clec1a* y se recogieron tumores y ganglios linfáticos el día 18 y se sometieron a Q-PCR para *inos*, *ifng* y *tnfa*. Los datos representan histogramas de expresión de *inos*, *ifng* y *tnfa* con respecto a *hprt* y se expresan en unidades arbitrarias (factor de cambio en comparación con la expresión en ratas TS compañeras de camada, valor de 1) para los tumores (n = 3) o en la relación de transcrito para los ganglios linfáticos (n = 6,* p < 0,05)

Figura 8: *CLEC-1* es expresado por macrófagos protumorales de tipo M2 y es expresado por células mieloides de mesotelioma de derrame pleural y de ascitis de tumor ovárico.

Se cultivaron monocitos humanos con M-CSF para generar macrófagos M0 y después con IFN γ , LPS o IL-4 para generar macrófagos M1 o M2 como se describe en Zajac, Blood, 2013). La expresión de *CLEC-1* se evaluó mediante Q-PCR (a) y mediante citometría de flujo (b), n = 4 *p < 0,05. Se recogió el derrame pleural del mesotelioma y se sometió a citometría de flujo para evaluar la expresión de *CLEC-1* en células mieloides CD45⁺ HLA DR⁺ CD16⁺ después del bloqueo de los receptores Fc con FcBlock y suero positivo para AB humano (control de isotipo) (c). Se recoge ascitis durante el cuidado rutinario de la paciente con carcinoma de ovario y las células mononucleares se aíslan después de un gradiente de Ficoll. Se aíslan células CD14⁺ humanas usando microperlas CD14 y selección positiva con AutoMACS. Después del bloqueo de los receptores de Fc con FcBlock y suero positivo para AB humano, las células CD14⁺ se tiñeron con un anticuerpo monoclonal de control de isotipo o un anti-*CLEC-1* humano (d).

EJEMPLO 1:

Materiales y métodos

Animales

Las ratas se adquirieron del "Centre d'Elevage Janvier" (Genest, Saint-Isle, Francia) y se llevaron a cabo procedimientos experimentales en estricta conformidad con los protocolos aprobados por el Comité de Ética en Experimentos con Animales de Países del Loira y autorizados por el Ministerio de Educación Superior e Investigación del Gobierno francés. Se generaron animales con inactivación de *Clec-1* (KO) mediante la instalación de plataforma de ratas transgénicas e inmunofenómica (SFR-Santé-Nantes) con la tecnología de nucleasas de dedos de cinc (ZFN) en el fondo endogámico de RT1a Lewis. La ausencia de proteína *CLEC-1* en el tamaño esperado de 32 kDa se confirmó mediante transferencia de Western.

Anticuerpos

Se generaron Ab monoclonales (mAb) anti-*CLEC-1* humano mediante hibridación somática de linfocitos (Biotem, Apprieu, Francia) mediante inmunización de ratones Balb/c con un péptido que codifica el dominio extracelular de h*CLEC-1* y seleccionado mediante cribado en proteína *CLEC-1* humana recombinante (RD system) mediante ELISA y después se purificaron mediante cromatografía en proteína A. El mAb anti-*CLEC1* humano (IgG-D6) fue de Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, CA). Anti- β -actina de rata purificada, CD3 (G4.18); anti-TCR $\alpha\beta$ -A647 o -A488 (R73) de rata, CD4-PECy7 (OX35), CD8-A488 (Ox8), IL-17-APC (ebio17B7), Foxp3-APC, IPN γ -FITC, CD11b-PerCP-Cy5.5 (WT.5), CD103 (α E integrina)-FITC y antifosfotirosinas humanas (p-Tyr) (4G10), CD4-PE, CD3-APC, CD45-PerCP, CD3-FITC, CD19-PE, CD16-PE, CD14-FITC HLA-DR-APC/Cy7, HLA-DR-FITC, CD11c-PECy7, CD11b-FITC CD80-FITC, CD86-FITC, CD83-FITC y control de isotipo IgG1 fueron de BD Biosciences (Franklin Lakes).

*Generación de ratas con inactivación *clec-1*^{-/-} (KO) mediante tecnología de nucleasas de dedos de cinc (ZFN).*

Se microinyectaron secuencias dirigidas a ZFN que codifican ARNm transcritas *in vitro* específicas para *clec-1* de rata (Sigma-Aldrich, San Luis, MO) en embriones fecundados en etapa unicelular como se ha descrito anteriormente. Las mutaciones en recién nacidos se detectaron mediante PCR. Uno de los fundadores que presentó una supresión de 7 pb que condujo a un codón de parada prematuro en el aminoácido 114 de *CLEC-1* que carece de la mayor parte del dominio extracelular. Los heterocigotos se sometieron a reproducción para generar compañeros de camada KO y de tipo silvestre (TS).

Generación de proteína de fusión CLEC-1 Fc de rata.

El ADNc que codificaba el dominio extracelular de *CLEC-1* (ADK94891 aminoácidos 74-261), se amplificó mediante PCR y los extremos 5' y 3' se marcaron con sitios de restricción ECORI BgIII, respectivamente. Después de la digestión, los productos de ADNc se clonaron y se insertaron en fase en el vector pFUSE-mIgG2Ae1-Fc2 v10 [Fab] (Invivogen, San Diego, CA) que contiene el fragmento Fc de IgG2a mutado en 3 aminoácidos para prevenir la unión de Fc γ RI. Los plásmidos se transfectaron en células eucariotas con lipofectamine según las instrucciones de los fabricantes (ThermoFisher). *CLEC-1* Fc se purificó del sobrenadante con una columna de afinidad HiTrap g (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA), se dializó usando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoFisher) y se cuantificó usando un equipo de reactivos de ensayos de proteínas BCA (Pierce). La pureza y la estructura de la proteína se confirmaron mediante SDS-PAGE seguido de tinción de Coomassie y análisis de transferencia de Western con IgG anti-ratón o anticuerpo anti-*CLEC-1* de rata como se describe en la sección de transferencia de Western de Materiales y métodos

complementarios. Se generó una forma truncada secretada recombinante de control de una fosfatasa alcalina embrionaria humana (hSEAP Fc) (pFUSE-SEAP-hFc, Invivogen) y se purificó en las mismas condiciones que CLEC-1 Fc.

5 Inmunización por KLH

Las ratas se inmunizaron sc. en la almohadilla plantar con proteína de hemocianina de lapa californiana (KLH) (Sigma) (100 µg) emulsionada (v:v) en 100 µl de adyuvante completo de Freund (CFA) (Difco) y los ganglios linfáticos poplíteos se recogieron 10 días después de la inmunización. Células totales marcadas con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) (Molecular Probes/Invitrogen) (5 µM) (1×10^5) o linfocitos T CD4⁺ purificados (1×10^5) más esplenocitos con agotamiento de linfocitos T (1×10^5) de ratas TS sin tratamiento previo fueron sometidas a exposición secundaria *in vitro* con KLH o proteína OVA irrelevante (25 µg/ml) durante 3 días.

Citometría de flujo y clasificación de células

Antes de la tinción, las células se sometieron a bloque Fc (BD Biosciences) como se describe en las instrucciones del fabricante. Para la tinción de citocinas intracelulares, las células se estimularon durante 4 horas con PMA e ionomicina (50 ng/ml y 1 µg/ml respectivamente) en presencia del inhibidor del transporte de proteínas GolgiStop (2 µl/pocillo) y se sometieron a fijación y permeabilización (solución de permeabilización de FACS) (todos los reactivos de BD Biosciences). Se midió el marcaje fluorescente de las células teñidas (2,5 µg/ml) usando un FACS LSR II (BD Biosciences) y se analizó con el software FlowJo® (Tree Star, Inc., Ashland).

Para la clasificación de células, se purificaron linfocitos T CD4⁺ de rata y CD CD11b⁺CD103⁺CD4⁺ y CD11b⁺CD103⁺CD4⁺ del bazo de ratas sin tratamiento previo mediante selección positiva usando un citómetro de flujo FACSaria (BD Biosciences) por TCR⁺ y CD4⁺ y por CD11b, Tinción de CD103 y CD4 respectivamente y para células humanas por SSC^{bajo}CD45⁺CD3⁺ o CD19⁺ para los linfocitos T y B respectivamente, SSC^{alto}CD45⁺CD16⁺ para neutrófilos, SSC^{bajo}CD45⁺CD14⁺ para monocitos y SSC^{bajo}CD45⁺HLA-DR⁺CD11c⁺, para CDc. La pureza fue >99 %. Las células muertas se excluyeron mediante la selección en células negativas para 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Generación de células, estimulación *in vitro* y reacción mixta de leucocitos (RML)

- Se generaron CD derivadas de monocitos humanos (CDmo) a partir de monocitos elutriados cultivados durante 7 días en medio RPMI 1640 completo (FCS sin endotoxinas al 10 % (Perbio Sciences), L-glutamina 2 mM (Sigma), piruvato de sodio 1 mM (Sigma), Hepes 1 mM (Sigma) y 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M (Sigma)), complementado con IL-4 (40 ng/ml; AbCys, París, Francia) y GM-CSF (1000 UI/ml; AbCys). A continuación, las células se estimularon durante 24 h (1×10^6 /ml) con LPS (0,5 µg/ml) (Sigma), Poli I:C (2 µg/ml) (Invivogen, San Diego, CA), R848 (2,5 µg/ml) (Invivogen), TGFβ1 humano recombinante (20 ng/ml) (R&D systems) como alternativa en presencia de 10 µg/ml de mAb anti-CLEC-1 o control de isotipo IgG1 previamente aplicado a placas y se sometieron a citometría de flujo o se cultivaron ($12,5 \times 10^3$) con 5×10^4 linfocitos T humanos alogénicos (equipo de aislamiento universal de linfocitos T (Myten)) durante 5 días (RML). Se añadieron marcador CLEC-1-His recombinante (R&D system) o proteínas alfa 1, 3 GT-6-His de cerdo recombinantes irrelevantes a 10 µg/ml en RML. La proliferación se midió mediante citometría de flujo mediante perfil CFSE en células CD3⁺CD4⁺ y citocinas IL-17 e IFN-γ evaluadas en sobrenadantes mediante ELISA.

- Se aislaron y cultivaron células endoteliales humanas (CE) de aorta (CEAH) o de vena umbilical (CEVUH) y se estimularon como alternativa con 1000 unidades/ml de TNFα humano recombinante (eBiosciences) durante 12 horas.

- Se cultivaron monocitos humanos con M-CSF para generar macrófagos M0 y después con IFNγ, LPS o IL-4 para generar macrófagos M1 o M2 como se describe en Zajac, Blood, 2013).

- Se recogió el derrame pleural de pacientes con mesotelioma y se sometió a citometría de flujo

- Se recoge ascitis durante el cuidado rutinario de la paciente con carcinoma de ovario y las células mononucleares se aíslan después de un gradiente de Ficoll. Se aíslan células CD14⁺ humanas usando microperlas CD14 y selección positiva con AutoMACS.

- Se estimularon linfocitos T CD4⁺ de rata con anti-CD3 unido a placa (Clon G4.18) (5 µg/ml). Se obtuvieron CD derivadas de la médula ósea (CDMO) de ratas compañeras de camada sin tratamiento previo, CLEC-1 TS y KO LEW.1A (RT1a) cultivando células durante 8 días en medio RPMI completo complementado con IL-4 de rata (4 ng/ml) y GM-CSF murino (1,5 ng/ml). A continuación, Las CDMO se estimularon con LPS (1 µg/ml) (Sigma) o zymozan (20 µg/ml) (Invivogen) durante 6 horas para el análisis del transcrito y durante 24 horas para la expresión de marcadores de maduración y para RML (cocultivo de 5 días con linfocitos T CD4⁺ alogénicos purificados de los ganglios linfáticos mesentéricos de ratas sin tratamiento previo LEW.1W (RT1u) marcadas con CFSE 5 µM). Como alternativa, se añadieron proteína de fusión CLEC-1 Fc de rata y hSEAP-Fc de control (10 µg/ml) en RML en presencia del inhibidor de endotoxina polimixina B (10 pg/ml) (Invivogen).

Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa en tiempo real

Se preparó ARN total de tejidos, tumores o células usando Trizol (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. El ADNc de órganos humanos agrupados era del sistema inmunitario humano y el Panel I de MTC de hombres o mujeres caucásicos (Clontech Mountain View). La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó usando el sistema de PCR en tiempo real ViiA 7 y la mezcla maestra de PCR SYBR® Green (Applied Biosystems). Se usó hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) como un gen de control endógeno para normalizar las variaciones en la cantidad inicial de ARN. La expresión relativa se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se expresó en unidades arbitrarias.

Inmunoprecipitación y transferencia de Western

Las CDmo humanas se sembraron en placas recubiertas con mAb anti-CLEC-1 o de isotipo IgG1 de control (Invitrogen) (10 µg/ml) durante 5 o 20 minutos en medio junto con zymozan (20 µg/ml) o sin él. Se lisaron CDmo, CEAH, CEVUH y HEK en tampón de lisis Nonidet P-40 al 1 % con cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma Aldrich). Se realizó inmunoprecipitación de CLEC-1 con 4 µg de mAb anti-CLEC1 humano (D6) seguido de incubación con perlas de proteína G-Sepharose. A continuación, las proteínas se trataron durante una noche con PNGasa F (Sigma Aldrich), se eluyeron y se disolvieron hirviendo durante 5 min en tampón de muestra de Laemmli. La concentración de proteína se determinó usando el equipo de ensayos BC con BSA como patrón (Interchim, San Pedro). Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con solución salina tamponada con Tween-20-Tris y leche al 5 % y se incubaron con 0,5 µg/ml de antifosfotirosina (4G10) o 2 µg/ml de mAb anti-CLEC1, seguido de Ab secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (Jackson immunoresearch, West Grove, PA.). El equipo de matriz de vías de NF-κB humano Proteome Profiler se realizó como se describe en las instrucciones del fabricante (R&D System). Se realizó detección por quimioluminiscencia usando sustrato de quimioluminiscencia West Pico (Thermofisher Scientific, Waltham, MA) y expresión de proteínas evaluada por Las 4000 (Fuji).

Inmunohistoquímica

Se fijaron neutrófilos, CDmo, células HEK293T transfectadas adherentes y células CEVUH (cultivadas en un cubreobjetos durante una noche) en paraformaldehído al 4 % (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, Estados Unidos) y se permeabilizaron excepto para CDmo con Triton X100 (0,1 %). Las células se tiñeron con mAb anti-CLEC1 (D6) o control de isotipo IgG1 (Invitrogen) (4 µg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente en PBS FCS 1 %, BSA 1 % y Fc Block para CDmo y después con anticuerpos secundarios anti-IgG1 de ratón Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 568, 1 h. Después de 10 min de incubación en PBS que contenía DAPI al 1 %, los portaobjetos se montaron usando reactivo antidesvanecimiento Prolong (Invitrogen) y se observaron mediante microscopia de fluorescencia (microscopio confocal Nikon A1 R Si). Se obtuvieron imágenes (X60 Plan Apo N.A: 1,4, zoom 2) con modo secuencial y se analizaron usando el programa ImageJ.

Modelos tumorales in vivo

Se inyectaron por vía intraportal células tumorales de hepatocarcinoma hepa 1.6 en el hígado de ratones b6 TS o deficientes en *Clec1a*. Se inyectaron por vía subcutánea células de glioma C6 (1 millón) en el flanco de ratas Sprague Dawley (spd) TS o deficientes en *Clec1a*.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa informático Graphpad Prism (La Jolla) con la prueba de t de Student no paramétrica no emparejada de dos colas (Mann-Whitney). Los resultados se consideraron significativos si los valores de p eran <0,05.

Resultados

Las CD mieloides humanas expresan CLEC-1 en la superficie celular.

Hasta ahora, solo se ha publicado información limitada sobre la expresión de CLEC-1 en seres humanos. Hasta ahora se ha descrito muy poco sobre la expresión, regulación y función de la proteína CLEC-1 humana. Solo hay una publicación acerca de la expresión de CLEC-1 que desvela que el CLEC-1 humano solo podría detectarse intracelularmente en células endoteliales con un patrón de tinción que se asemeja a las proteínas del retículo endoplásmico y que ni el TGF-β ni los estímulos inflamatorios podrían promover una translocación significativa a la superficie celular (The human C-type lectin-like receptor CLEC-1 is upregulated by TGF-β and primarily localized in the endoplasmic membrane compartment. Sattler *et al.*, ScandJ Immunol. marzo de 2012; 75 (3): 282-92). Por tanto, la única información disponible en el estado de la técnica sobre hCLEC-1 (es decir, la localización intracelular en células endoteliales) es contraria a lo que se conocía en la rata (es decir, rCLEC-1 localizado en la superficie de células endoteliales y mieloides).

Los inventores observaron mediante RT-PCR cuantitativa una fuerte expresión de los transcritos de CLEC-1 en pulmón y placenta y una expresión más moderada en órganos linfoides tales como el timo, ganglios linfáticos, bazo y amígdalas (datos no mostrados). En subtipos de células humanas, se encontraron abundantes transcripciones de CLEC-1 en neutrófilos, monocitos, CDmo y CEAH (figura 1A) y no se detectó ningún transcrito en los linfocitos T y B.

La presencia de la proteína CLEC-1 en las CDmo y las CE se confirmó mediante inmunoprecipitación de CLEC-1 seguida de transferencia de Western (datos no mostrados) y contrasta con la baja cantidad observada en las células HEK epiteliales. Los inventores generaron un mAAb de ratón anti-CLEC-1 humano dirigido contra el dominio extracelular y observaron una baja expresión ectópica de CLEC-1 en la superficie celular de las células HEK transfectadas, corroborando lo que se ha descrito previamente en la bibliografía (datos no mostrados). En cuanto a otros CLR, CLEC-1 puede requerir otras cadenas adaptadoras, otros PRR o glucosilación suficiente para una expresión eficiente, transporte y estabilidad de la superficie celular. La expresión en superficie celular de la proteína CLEC-1 se confirmó mediante inmunohistoquímica en células transfectadas (datos no mostrados).

Con el mAAb generado, demostraron mediante citometría de flujo por primera vez, según el conocimiento de los inventores, la expresión en superficie celular de CLEC-1 en una subpoblación de CD mieloides circulantes de sangre humana CD16⁺ (CD45⁺CD14⁺HLA-DR^{alto}CD11c⁺) y en monocitos CD14⁺CD16⁺ (CD45⁺CD14⁺CD16⁺). No se observó ninguna expresión en la superficie celular en la subpoblación de CD mieloides BDCA3⁺ (BDCA3⁺CD45⁺HLA-DR^{alto}CD11c^{bajo}) ni en CD plasmacitoides CD123⁺ (CD123⁺CD11c⁺HLA-DR^{alto}) (datos no mostrados). Se observó una baja expresión de CLEC-1 en la superficie celular de los neutrófilos o CEAH, cuya expresión es, como se ha indicado anteriormente, principalmente intracelular (figura 1B). La misma localización de la proteína CLEC-1 se observó mediante inmunohistoquímica con una tinción de CLEC-1 intracelular en neutrófilos humanos y CE y una expresión de la superficie celular en las CD (datos no mostrados). Cabe destacar que, de manera similar a lo que se ha descrito anteriormente en rata, los inventores observaron que la expresión de CLEC-1 en seres humanos está regulada negativamente en las CD por estímulos inflamatorios tales como ligandos de TLR y regulada positivamente por TGFβ (gráficos de puntos representativos e histograma de IFM, figura 1C respectivamente).

La activación de CLEC-1 en CDmo humanas suprime la activación de Th17 alogénica posterior in vitro.

Ya que todavía no se han identificado ligandos naturales de CLEC-1, los inventores usaron mAAb anti-CLEC-1 humano para imitar el ligando y reticular CLEC-1 en la superficie celular de las CDmo. Después de la inmunoprecipitación de CLEC-1 en condiciones poco rigurosas, observaron mediante transferencia de Western que no había fosforilación de tirosina en el tamaño esperado de CLEC-1 (32 kDa) después de la activación de CLEC-1, lo que sugiere que el motivo de tirosina en la cola citoplasmática no está fosforilado directamente (datos no mostrados). No obstante, se han observado varios cambios en los patrones de fosforilación de tirosina con fosforilación mejorada o disminuida de varias bandas de aproximadamente 40-50 kDa de tamaño, lo que sugiere fuertemente que CLEC-1 es un receptor funcional que señala a través de socios de unión que quedan por identificar.

A continuación, los inventores investigaron si la activación de CLEC-1 modula la maduración de las CDmo inducida por TLR, como se describe para otras CLR activantes o inhibidoras. Observaron que la activación de CLEC-1 no induce por sí misma ni potencia ni suprime el estado de maduración inducido por LPS de las CDmo según la expresión de los marcadores de activación CD80, CD86, CD83 y HLA-DR (figura 2A) y la producción de TNFα, IL-12, IL-6, IL-23 o IL-10 (figura 2B). Se observaron resultados similares con otros ligandos de TLR (datos no mostrados).

A continuación, los inventores evaluaron el efecto de la activación de CLEC-1 sobre la capacidad de las CDmo para polarizar una respuesta de linfocitos T alogénicas corriente abajo. No se observó ninguna diferencia en la posterior proliferación de linfocitos T alogénicos después de la activación de CLEC-1 solo (figura 2C) o en combinación con TLR (datos no mostrados). Sin embargo, indicaron significativamente menos de IL-17 y más de IFNγ secretado por linfocitos T alogénicos, lo que sugiere que la activación de CLEC-1 en las CDmo han reducido la activación de Th17 alogénica posterior y ha sesgado la respuesta hacia una Th1 (figura 2C).

Ya que la señalización de CLR condujo a la activación de NF-κB, investigaron el nivel y la activación de proteínas relacionadas con la vía de NF-κB por Proteome Profiler después de la activación de CLEC-1 solo o junto con cimosano, un agonista de las vías de señalización tanto de DECTIN-1 como de TLR. Los inventores observaron que, en contraste con zymozan, la activación de CLEC-1 no induce por sí misma la activación de la vía de NF-κB evaluada por la degradación del inhibidor de NF-κB, IκBα, y por la fosforilación de la subunidad de RelA p65 (Ser529) (datos no mostrados). Sin embargo, indicaron que la conjunción de la activación de CLEC-1 ha reducido la degradación de IκBα inducida por zymozan. Sin embargo, no se observó una reducción significativa de la fosforilación de la subunidad p65. Ya que la fosforilación en la Ser529 es independiente de IKKβ, estos datos sugieren que CLEC-1 puede inhibir particularmente la vía de activación de IKKβ. En conjunto, estos datos sugieren que la activación de CLEC-1 en CDmo humanas es funcionalmente activa y que, aunque no se observa un efecto significativo sobre la producción de citocinas, puede regular las vías de señalización de NF-κB inducidas por PRR para modular finamente su estado de activación y suprimir la respuesta de Th17 corriente abajo.

La interrupción de la señalización de CLEC-1 en las CDmo de rata mejora las respuestas de linfocitos T in vitro.

Para conocer mejor la función de CLEC-1, los inventores generaron ratas deficientes en CLEC-1. Las ratas deficientes en CLEC-1 eran viables, sanas y nacieron de la reproducción heterocigótica con la frecuencia mendeliana esperada. En "estado estacionario", las ratas deficientes en CLEC-1 presentaron compartimentos de células inmunitarias mieloides y linfoides regulares en la sangre y los órganos linfoides periféricos (datos no mostrados).

Los inventores generaron CDMO a partir de ratas deficientes en CLEC-1 y observaron que estas células se diferencian y maduran normalmente en respuesta a la estimulación con LPS (CD80, CD86, MHC de clase I y II) (datos no mostrados). Curiosamente, observaron que después de la activación por LPS o cimosano, las CDMO deficientes en CLEC-1 expresaron un nivel mayor de transcritos de IL-12p40 que las CDMO de ratas de tipo silvestre (datos no mostrados). No se observaron diferencias significativas para la expresión de IL-6, IL-23, TGFβ e IL-10. Sin embargo, sorprendentemente, las CDMO deficientes en CLEC-1 indujeron una mayor proliferación de linfocitos T alógenicos CD4⁺ que se asociaron con una mayor activación de linfocitos T Th17 (figura 3).

Para confirmar adicionalmente estos datos, los inventores generaron la proteína de fusión CLEC-1 Fc de rata (datos no mostrados). Esta proteína de fusión consistía en el dominio extracelular de CLEC-1 de rata fusionado con el fragmento Fc de IgG mutado en 3 aminoácidos para evitar la unión de FcγRI, debería bloquear las interacciones de CLEC-1 en las CDMO con sus ligandos potenciales y, por tanto, imitar la deficiencia de CLEC-1. De manera similar, observaron en presencia de la proteína de fusión CLEC-1 Fc en el RML *in vitro*, una proliferación más prominente de linfocitos T efectores alógenicos distintos de Foxp3 y más activación de Th17 (figura 4). Cabe destacar que, no se observó inducción de Th-17 con CLEC-1 Fc en linfocitos T purificados después de la activación policlonal anti-CD3 (datos no mostrados), lo que demuestra que este efecto era específico de la interrupción de la señalización de CLEC-1 en las CDMO y no debido al ligamiento de CLEC-1 Fc y efecto agonista sobre un ligando potencial en linfocitos T.

Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la ausencia de señalización de CLEC-1 en las células mieloides, notablemente en CD mejoró su estado de activación necesario para la activación y proliferación eficiente de linfocitos T *in vitro*.

La deficiencia de CLEC-1 mejora la respuesta de linfocitos T mediada por CD in vivo.

A continuación, los inventores investigaron la función potencial de CLEC-1 *in vivo* en la diferenciación de Th mediada por CD después de la inmunización mediante inyección subcutánea con el antígeno extraño hemocianina de lapa californiana (KLH) y adyuvante completo de Freund. En primer lugar, evaluaron la expresión de transcritos de CLEC-1 en diferentes subtipos de CDc CD103⁺ CD11b⁺ en ganglios linfáticos. Curiosamente, observaron que la expresión de CLEC-1 está restringida a CD CD4⁺ correspondientes a CD CD8α⁺ en ratones especializados para la fagocitosis de células muertas y que presentan actividad citotóxica (figura 5A).

Después de la inmunización, observaron después de la exposición secundaria *in vitro* de ganglios linfáticos de drenaje, una mayor proliferación de linfocitos T CD4⁺ específicos de KLH de ratas inmunizadas deficientes en CLEC-1 que se asoció con un mayor número de linfocitos T IL-17⁺, IL-17⁺IFNγ⁺ e IFNγ⁺ CD4⁺ (histograma y gráficos de puntos representativos, figura 5B). Cabe destacar que, también se observó mejor respuesta de recuerdo a KLH con linfocitos T CD4⁺ purificados de ratas inmunizadas deficientes en CLEC-1 en presencia de CD de ratas de tipo silvestre que demuestran un aumento específico en la sensibilización de linfocitos T *in vivo* en ausencia de CLEC-1 (datos no mostrados).

Estos datos demuestran *in vivo* que la deficiencia de la señalización de CLEC-1 en las CDc agrava la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T corriente abajo.

Análisis

En este estudio, los inventores demostraron por primera vez hasta donde conocen los inventores, que CLEC-1 humano es un receptor regulador funcional de la superficie celular de CD que suprime la respuesta de Th17 efectora posterior. Por otra parte, las ratas deficientes en CLEC-1 revelaron una función *in vivo* para CLEC-1 en la prevención de la sensibilización excesiva de linfocitos T CD4⁺ mediada por CD. Como en la rata, observaron que la expresión de CLEC-1 en las CDmo humanas es disminuida por los estímulos inflamatorios y está regulada positivamente por el TGFβ. Este perfil de expresión en CD con una disminución después de la estimulación inflamatoria representa una respuesta clásica observada para otros receptores inhibidores tales como MICL o DCIR que también se ha mostrado que suprimen respuestas de linfocitos T *in vivo* e inflamación (Uto T. *et al.* Clec4A4 is a regulatory receptor for dendritic cells that impairs inflammation and T-cell immunity. Nat Commun. 2016; 7: 11273) (Redelinghuys P, *et al.* MICL controls inflammation in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2015). Curiosamente, los inventores descubrieron que CLEC-1 se expresa en rata por la subpoblación CD4⁺ de CDc en órganos linfoides. Esta subpoblación de CD corresponde a homólogos de ratones de CD CD8α⁺ implicados en la actividad citotóxica y fagocitosis de células muertas y que se describe como los principales productores de IL-12 e implicados en la presentación cruzada de antígenos tumorales. Este patrón de expresión contrasta con el receptor inhibidor DCIR-2 que se ha mostrado que está restringido a CDc CD8α⁺. No obstante, en sangre humana, se observó que CLEC-1 se expresaba en la superficie celular en una subpoblación de CD mieloides CD16⁺CD14⁺ y no en CD BDCA3⁺, los homólogos humanos de CD CD8α⁺. Esta discrepancia entre seres humanos y roedores justifica una mayor investigación. Los inventores observaron que la interrupción de la señalización de CLEC-1 mejora particularmente la activación de Th17 mediada por CD *in vitro* pero las respuestas tanto Th1 como Th17 aumentaron después de la inmunización *in vivo*. Esto sugiere que CLEC-1 puede suprimir de manera diferente las respuestas de Th1 y Th17 según el acoplamiento conjunto de PRR. Por el contrario, DECTIN-1 que actúa como receptor activador en CD, promueve de manera diferente el equilibrio Th17/Th1 según los ligandos y el acoplamiento conjunto de PRR regulando finamente la secreción de las citocinas polarizantes IL-12 e IL-

23 (Gringhuis SI, *et al.* Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol.* 2009; 10 (2): 203-213) (LeibundGut-Landmann S, *et al.* Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol.* 2007; 8 (6): 630-638) (Lee EJ, *et al.* Mincle Activation and the Syk/Card9 Signaling Axis Are Central to the Development of Autoimmune Disease of the Eye. *J Immunol.* 2016; 196 (7): 3148-3158). Por ejemplo, en respuesta a la exposición a *Aspergillus fumigatus*, se mostró que DECTIN-1 en ratones potencia la diferenciación de Th17 notablemente al disminuir la expresión de IFN- γ e IL12p40 disminuyendo de este modo la polarización de Th1. Curiosamente, los inventores no observaron que la señalización de CLEC-1 en CD suprime la expresión inducida por PRR de citocinas polarizantes Th17 y observaron solo un efecto sobre la producción de IL-12p40 en CDMO de ratas KO. Estos resultados sugieren que CLEC-1 en CD puede dar forma al equilibrio Th17/Th1 por otros mecanismos distintos de la expresión de citocinas polarizantes. Por ejemplo, se ha mostrado que la señalización de DECTIN-1 influye en el destino de la polarización de linfocitos T al modular también la expresión de las moléculas coestimulantes ligando Ox40 en las CD (Joo H, *et al.* Opposing Roles of Dectin-1 Expressed on Human Plasmacytoid Dendritic Cells and Myeloid Dendritic Cells in Th2 Polarization. *J Immunol.* 2015; 195 (4): 1723-1731). Curiosamente, los inventores observaron que la activación de CLEC-1 en CD humanas previene la degradación de I κ B α inducida por la señalización de DECTIN-1. Por lo tanto, CLEC-1 también puede prevenir la vía de señalización de Card9 mediada por la activación de CLR y se sabe que mantiene específicamente la respuesta de Th17.

No han podido detectar con la proteína de fusión CLEC-1 Fc las células que expresan ligandos endógenos. No obstante, sus datos sugieren que los ligandos de CLEC-1 pueden ser expresados por células hematopoyéticas o liberados "de forma natural" o en un contexto particular de daño celular o tisular. Los ligandos pueden ser expresados por las propias células que expresan CLEC-1 como sucede para DCIR-2 o, como alternativa, en los linfocitos T. Se ha informado de que el ligando endógeno DECTIN-1 es expresado por linfocitos T que, en contraste con CLEC-1, actúa como una molécula coestimulante que mejora la proliferación de linfocitos T (Ariizumi K, *et al.* Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem.* 2000; 275 (26): 20157-20167).

Estos hallazgos establecen la relevancia de CLEC-1 en las CD en el control estricto del grado y la calidad de la activación de linfocitos T corriente abajo y como receptor de la superficie celular puede proporcionar una herramienta terapéutica para manipular la respuesta de linfocitos T.

Por lo tanto, CLEC-1 como receptor inhibidor de la superficie celular en células mieloides destaca una diana potencial para la intervención terapéutica y un nuevo paradigma de tratamiento en el cáncer.

Varios estudios experimentales demuestran que los CLR contribuyen a la progresión del cáncer y su diseminación metastásica por su función en la adhesión celular o en la conformación de la respuesta de linfocitos T ((Yan, Kamiya *et al.* 2015; Ding, Yao *et al.* 2017). Por ejemplo, se ha mostrado que los receptores inmunomoduladores DC-SIGN, MINCLE, DCIR y BDCA-2 inhiben la activación de las células mieloides, inflamación y son fundamentales para impulsar la expansión de Treg Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ (Yan, Kamiya *et al.* 2015; Ding, Yao *et al.* 2017). DC-SIGN reconoce el antígeno carcinoembrionario sobreexpresado en casi todos los carcinomas humanos (Nonaka, Ma *et al.* 2008) y promueve la secreción de las citocinas inmunosupresoras IL-10 e IL-6 por las células mieloides. Además, se descubrió que los polimorfismos en el promotor del gen DC-SIGN estaban asociados con un mayor riesgo en pacientes con cáncer colorrectal (Lu, Bevier *et al.* 2013). Se mostró que MINGLE mejora en los leucocitos infiltrantes de tumores en el adenocarcinoma ductal pancreático y especialmente por las células supresoras mieloides (MSC). El ligamiento de MINCLE con SAP130 (una subunidad del complejo de histona desacetilasa) liberado de células moribundas induce una fuerte supresión peritumoral (Seifert, Werba *et al.* 2016). De manera similar, se ha mostrado que el CLR LOX-1 se mejora específicamente en la superficie celular de la sangre o en los neutrófilos infiltrantes de tumores (de 15 a 50 %) en pacientes con cáncer, mientras que es casi indetectable en la sangre de donantes sanos (Condamine, Dominguez *et al.* 2016). En este estudio, mostraron que la tensión del retículo endoplásmico induce la expresión de LOX-1 y convierte los neutrófilos en MSC con una fuerte función supresora.

Por el contrario, se ha mostrado que el desencadenamiento de la señalización de CLR de activación, tal como DECTIN-1, activa la inmunidad antitumoral y disminuye los Treg y CMM (Tian, Ma *et al.* 2013). La administración de beta-glucanos, un ligando de DECTIN-1 inhibe el crecimiento tumoral en modelos de carcinoma murino (Li, Cai *et al.* 2010; Masuda, Inoue *et al.* 2013; Tian, Mamá *et al.* 2013), en melanoma humano, neuroblastoma, modelos de xenoinjerto de linfoma (Modak, Koehne *et al.* 2005), así como en el cáncer de ovario y gástrico humano (Inoue, Tanaka *et al.* 1993; Oba, Kobayashi *et al.* 2009).

Por lo tanto, la potenciación de CD o, más ampliamente, la activación de células mieloides por el antagonista de CLEC-1 puede representar una diana de punto de control inmunitario para modular el sistema inmunitario de linfocitos T efectores corriente abajo que podrían tener una implicación clínica importante en el cáncer.

EJEMPLO 2

Los inventores han mostrado previamente en ratas que el bloqueo de CLEC-1 con la proteína de fusión CLEC-1 Fc potencia la proliferación de linfocitos T en una reacción mixta de leucocitos (RML) (véase ejemplo 1). Han generado varios mAb dirigidos contra la parte extracelular de CLEC-1 humano y muestran que un mAb parece antagonista de

la señalización de CLEC-1 y, por tanto, mejora la proliferación de linfocitos T y la producción de IFN- γ en la reacción mixta de leucocitos (RML). RML consistía en linfocitos T purificados aislados de sangre periférica (5×10^4) mezclados con células dendríticas derivadas de monocitos alogénicos ($12,5 \times 10^3$) que expresa un alto nivel de CLEC-1. Se añadieron control de isotipo (IgG1) o anticuerpo anti-CLEC-1 humano a dosis de 0,5 a 10 μ g/ml durante 5 días. A continuación, se evaluó la proliferación de linfocitos T mediante dilución de éster succinimidílico de carboxifluoresceína y se evaluó la expresión de IFN γ mediante citometría de flujo en linfocitos T y mediante ELISA en sobrenadantes (histogramas y gráficos representativos de las figuras 6A y 6B, 6C).

EJEMPLO 3

CLEC-1 se expresa mucho en tumores y desempeña una función funcional en la inmunidad tumoral

En un modelo de hepatocarcinoma de ratón (inyección intraportal de células tumorales hepa 1.6), los inventores observaron una expresión aumentada y duradera de CLEC-1 en tumores (figura 7a). Resulta importante que, en este modelo, los ratones deficientes en CLEC-1 (amablemente donados por Derrick J. Rossi, Harvard Stem Cell Institute, Cambridge) son más resistentes al crecimiento tumoral y presentan una mayor tasa de supervivencia (mediana de supervivencia de 28 d en KO frente a 21 d en TS) (figura 7b). De forma similar, en un modelo de glioma de rata subcutáneo (sc.) (C6), los inventores observaron la regresión total de los tumores en 3 de 5 de las ratas deficientes en CLEC-1 (generado por tecnología ZFN en el laboratorio de los inventores) (figura 7c). Cabe destacar que, por Q-PCR en tumores recogidos el día 18 después de la inoculación de células tumorales, una mayor expresión de ARNm de *inos*, *tnfa* e *ifng* se evaluaron en el tumor de ratas deficientes en CLEC-1 (figura 7d). Además, se detectó una mayor expresión de ARNm de *ifng* en los ganglios linfáticos (figura 7d). Estos datos demuestran una mejor respuesta antitumoral en ratas deficientes en CLEC-1 y sugieren que la ausencia de CLEC1 ha inducido más macrófagos M1 antitumorales y más linfocitos T citotóxicos y Th1.

La expresión de CLEC-1 está restringida a CDc especializados en presentación cruzada

Curiosamente, los inventores observaron tanto en ratas como en ratones que la expresión de CLEC-1 por las CDc de órganos linfoides secundarios está restringida al subconjunto específico de CD especializadas en la presentación cruzada de antígenos (CD4+ en rata, CD8 α + en ratones) (figura 5A). Se mostró que estas células secretan un alto nivel de IL-12 y son responsables de la activación de la respuesta de linfocitos T (CTL) CD8+ citotóxicos antitumorales. Por lo tanto, actuando como un receptor inhibidor en estos subconjuntos especializados de CD, la activación de CLEC-1 puede prevenir la producción de IL-12, la presentación cruzada eficaz y respuesta de CTL hacia antígenos tumorales.

CLEC-1 es expresado por macrófagos protumorales de tipo M2 y es expresado por células mieloides de mesotelioma de derrame pleural y de ascitis de tumor ovárico.

Los inventores observaron una mayor expresión de CLEC-1 tanto en los transcritos (a) como en el nivel de proteína (b) en macrófagos protumorales de tipo M2 humanos en comparación con macrófagos antitumorales de tipo M1 o en comparación con macrófagos M0 (figura 8). Asimismo, observaron la expresión de la proteína CLEC-1 en la superficie celular en células mieloides humanas CD45+ HLADR+ CD16+ del mesotelioma de derrame pleural (c) y en células mieloides CD14+ de ascitis de carcinoma de ovario (d) en comparación con el isotipo de control (figura 8). Estos datos demuestran que la expresión de CLEC-1 se mejora en las células mieloides en el microambiente tumoral y podría desempeñar una función fundamental en el escape inmunitario del tumor.

En conclusión, en vista de los resultados anteriores (en particular, los resultados que muestran que la proteína de fusión CLEC-1 Fc y los anticuerpos dirigidos contra la parte extracelular de CLEC-1 humano mejoran la proliferación de linfocitos T), parece creíble que los antagonistas de CLEC-1 puedan usarse para el tratamiento del cáncer.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un antagonista de CLEC-1 humano y un excipiente farmacéutico aceptable para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que padece cáncer.
2. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde el sujeto humano padece un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de cerebro y del sistema nervioso central, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino de la enfermedad de Castleman, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe e hipofaringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma, plasmacitoma, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de la cavidad oral y orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de hipófisis, cáncer de próstata, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de glándula salival, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de vagina, cáncer de vulva y cáncer de útero.
3. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el antagonista de CLEC-1 humano es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
4. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3, en donde el antagonista de CLEC-1 humano se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y monoclonales completamente humanos; o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.
5. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3 o 4, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente al dominio extracelular de CLEC-1 humano.
6. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el antagonista de CLEC-1 humano es un polipéptido.
7. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en donde el polipéptido es un equivalente funcional de CLEC-1 humano.
8. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, en donde el polipéptido es un equivalente funcional de CLEC-1 humano fusionado con un dominio constante de inmunoglobulina.
9. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el antagonista de CLEC-1 humano es un aptámero.
10. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el cáncer se trata promoviendo la respuesta de linfocitos T.
11. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en combinación con un tratamiento convencional del cáncer.
12. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en combinación con un agente seleccionado de un agente quimioterapéutico, una terapia dirigida contra el cáncer, un agente inmunoterapéutico o radioterapia, en particular para un uso simultáneo, separado o secuencial.
13. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en donde el agente se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente inmunógeno antineoplásico, un agente de control del ciclo celular/regulador de la apoptosis, un anticuerpo antineoplásico y un agente regulador hormonal.

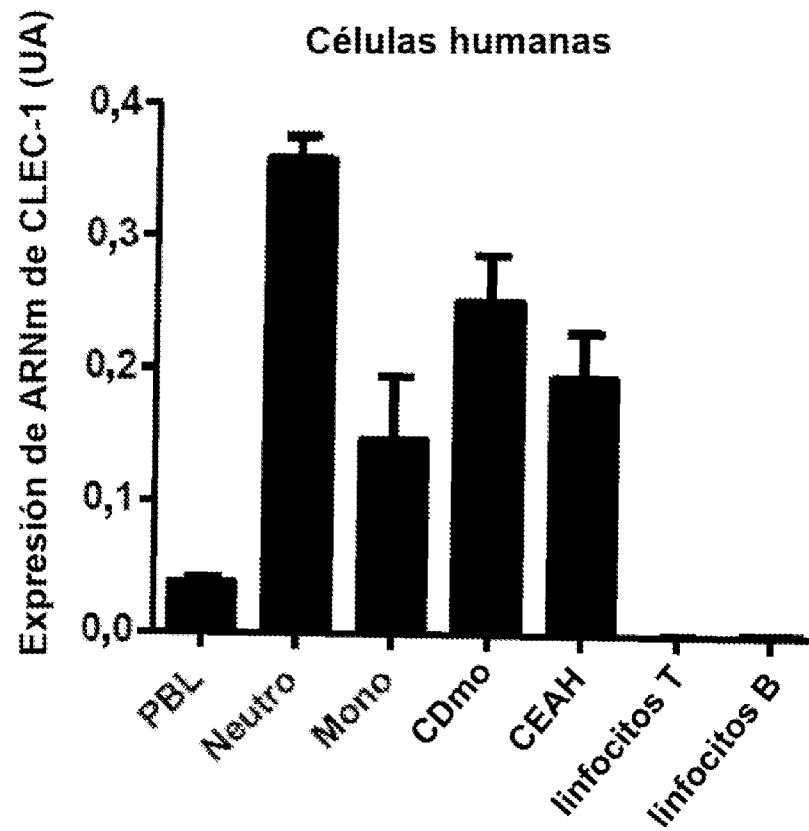


Figura 1A

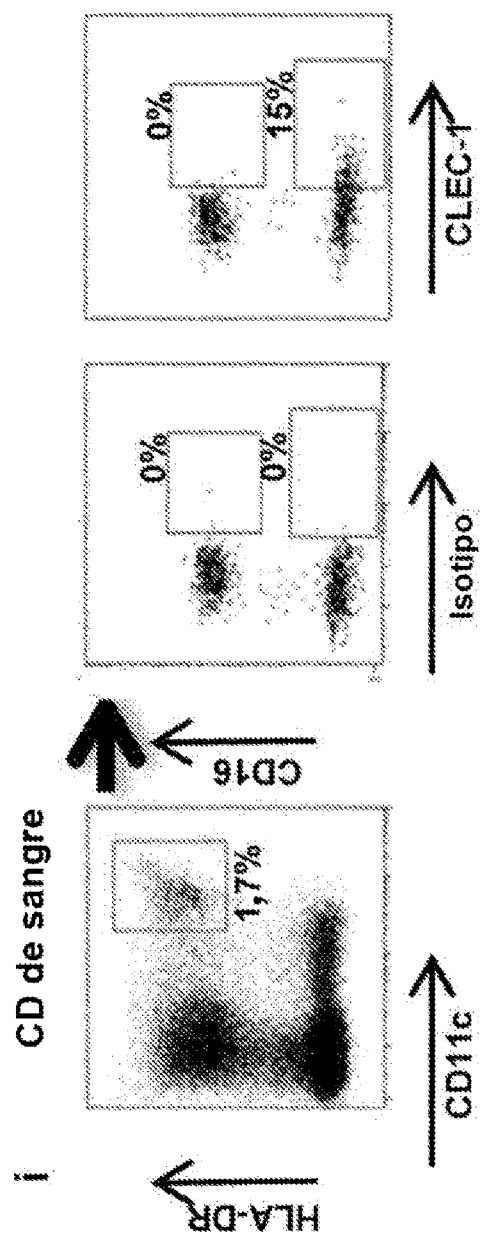


Figura 1B (i)

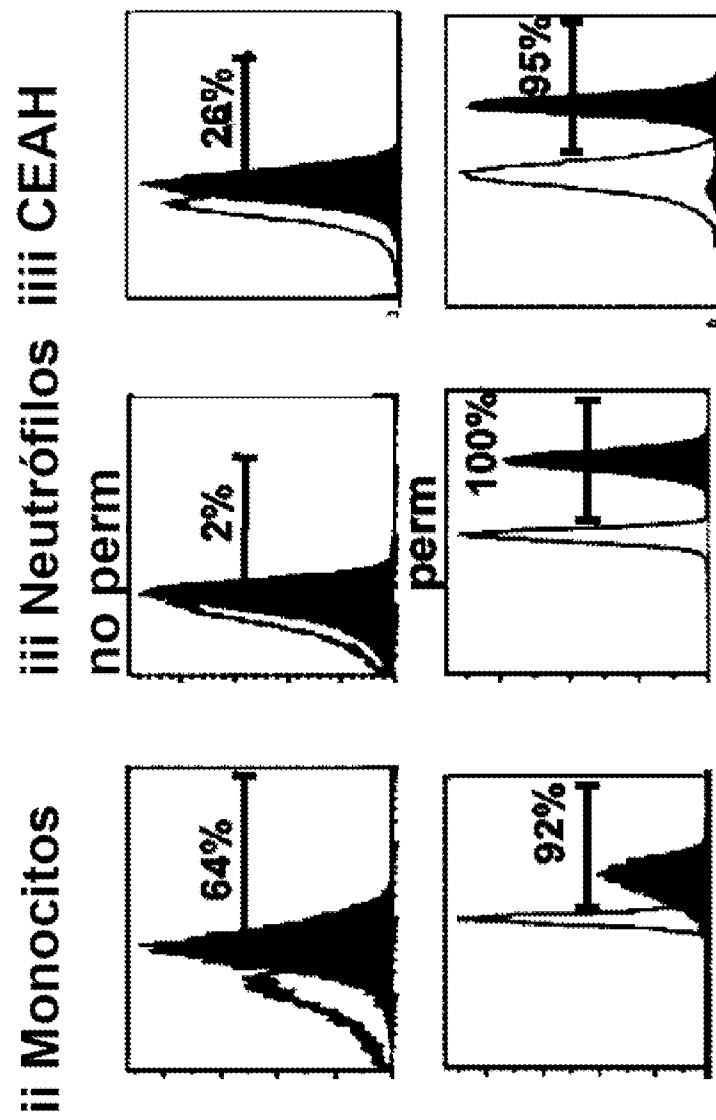


Figura 1B (ii)

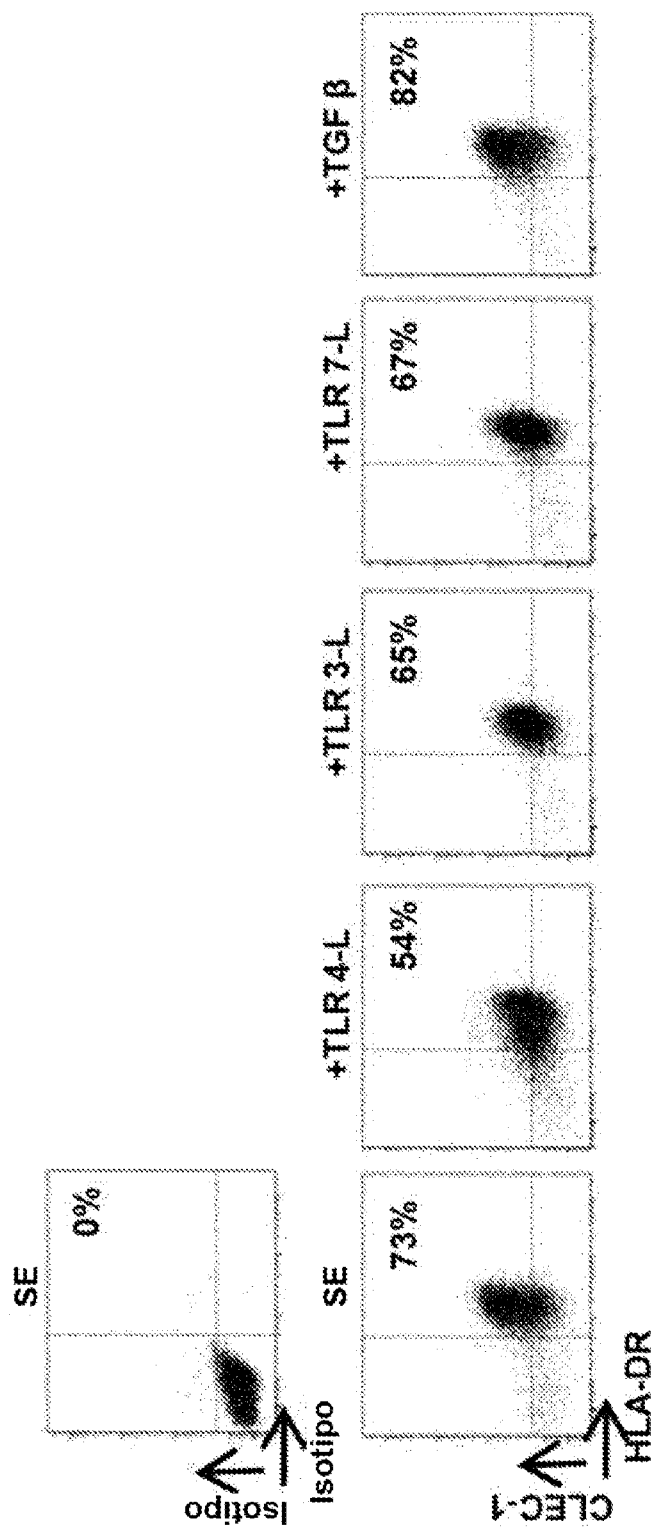


Figura 1C

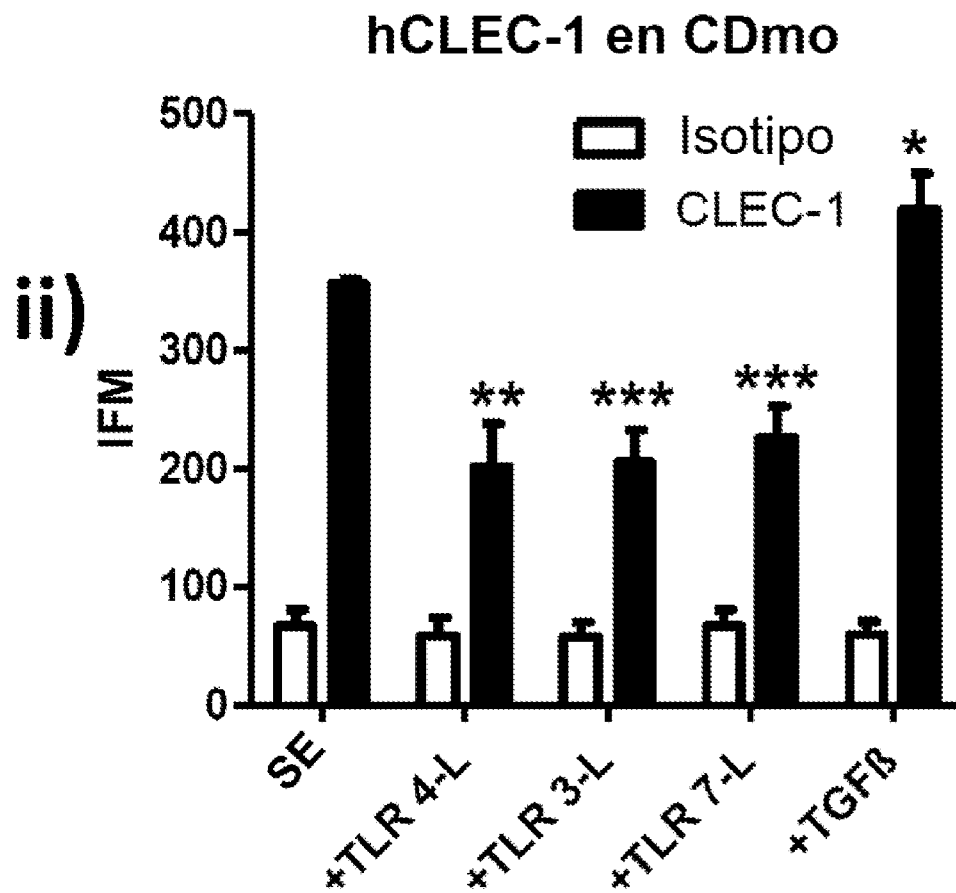


Figura 1C (segunda parte)

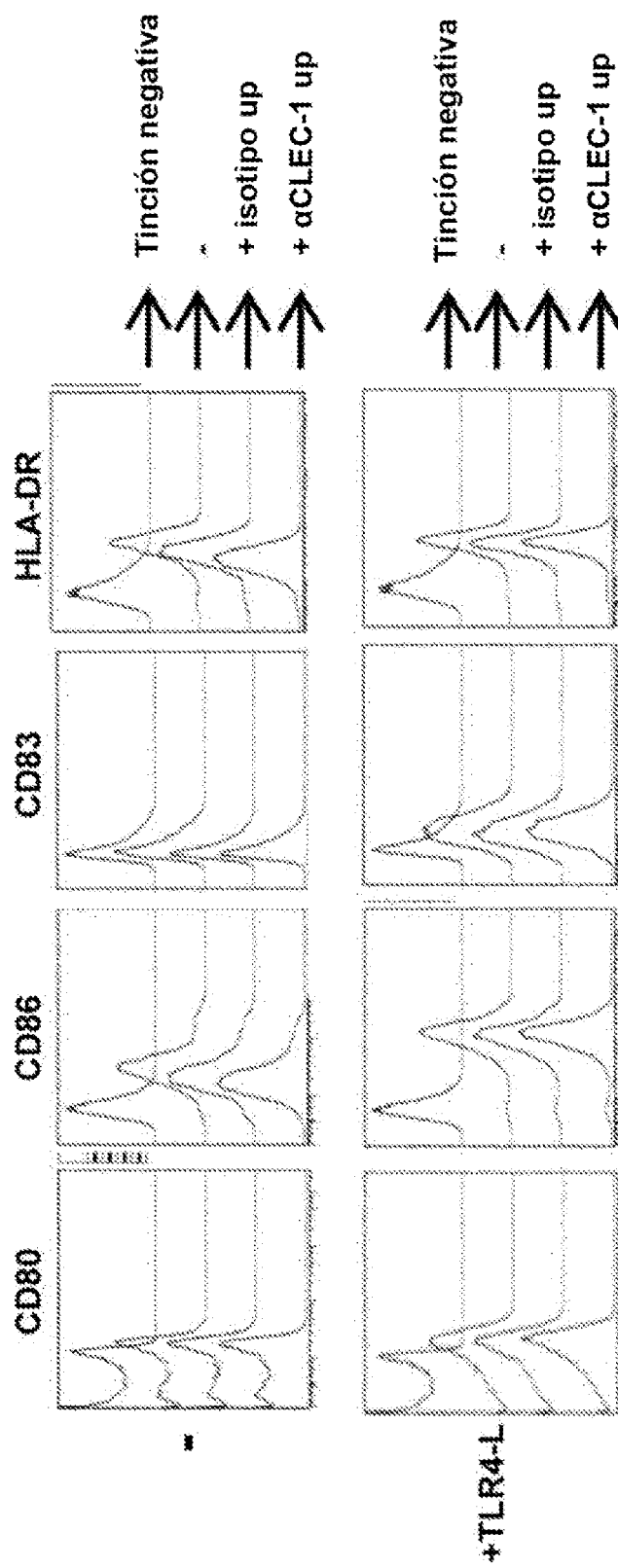


Figura 2A

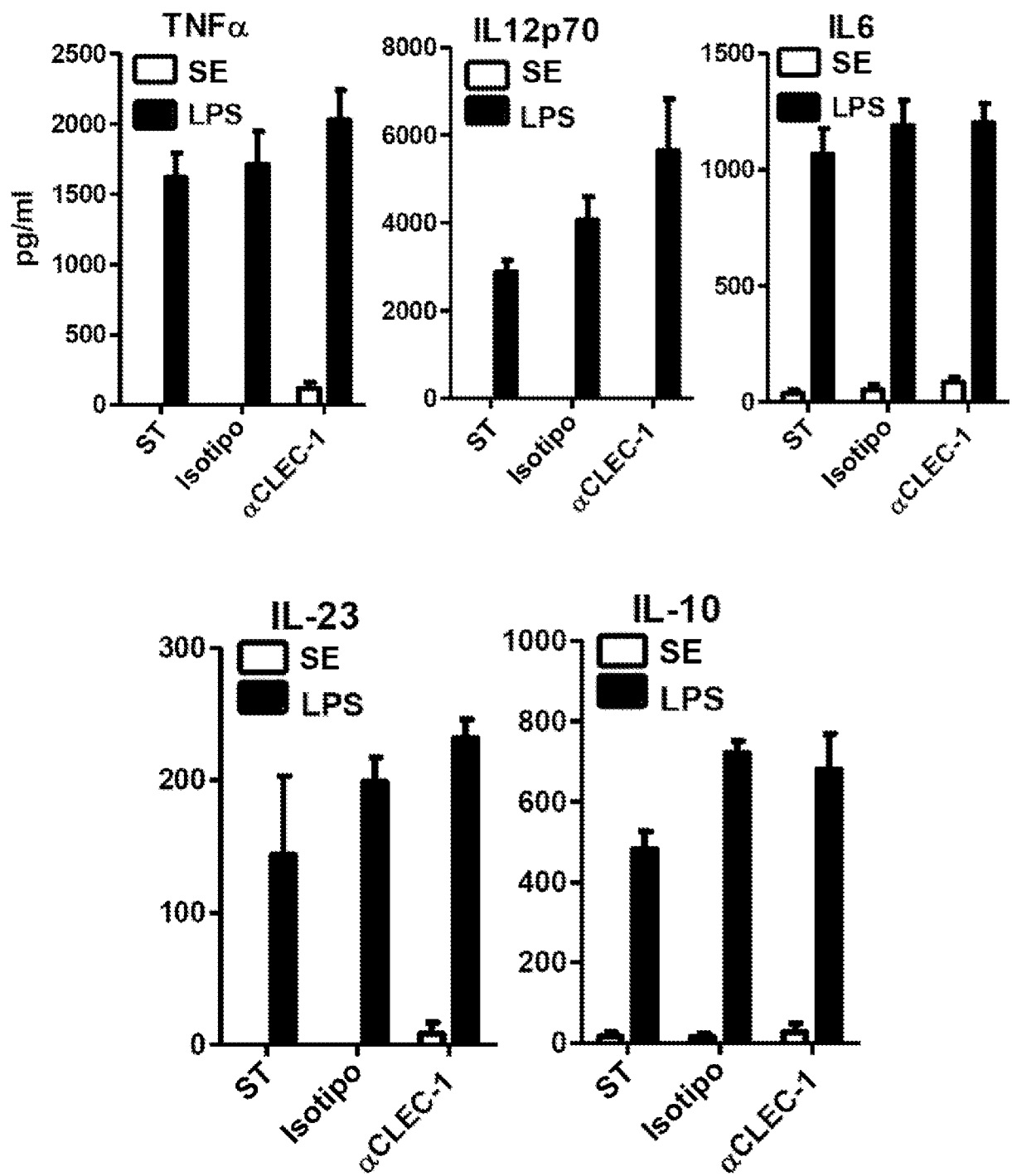


Figura 2B

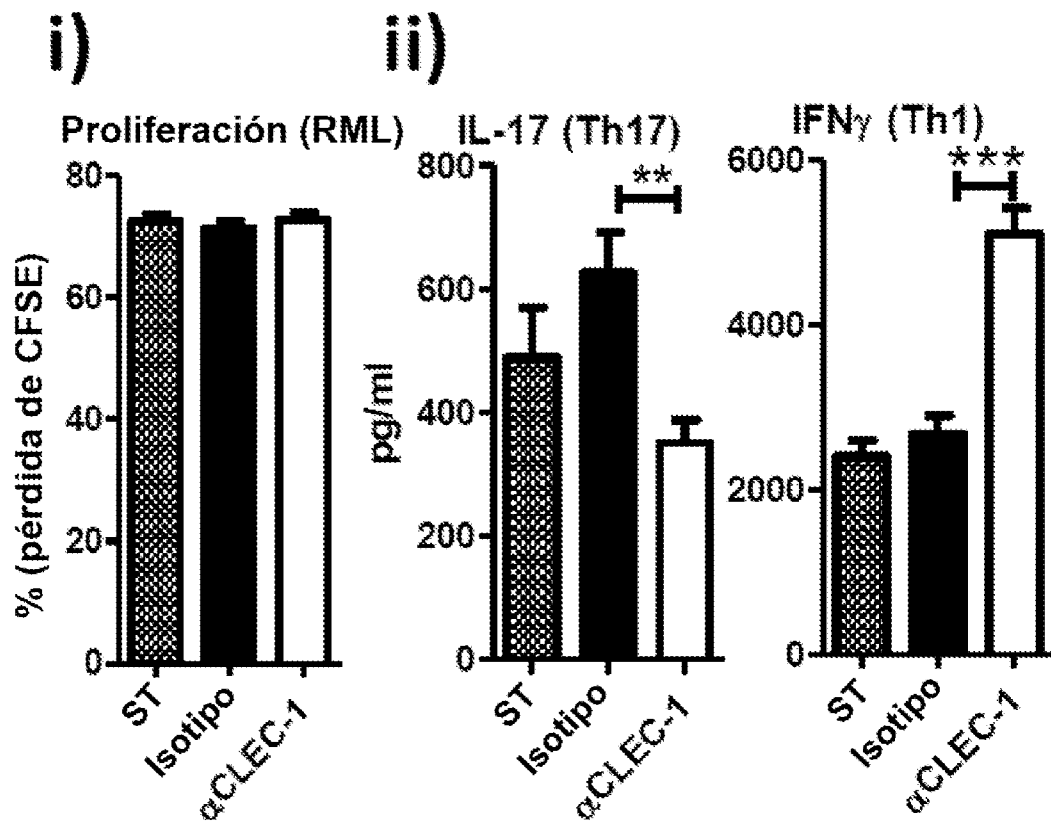


Figura 2C

i)

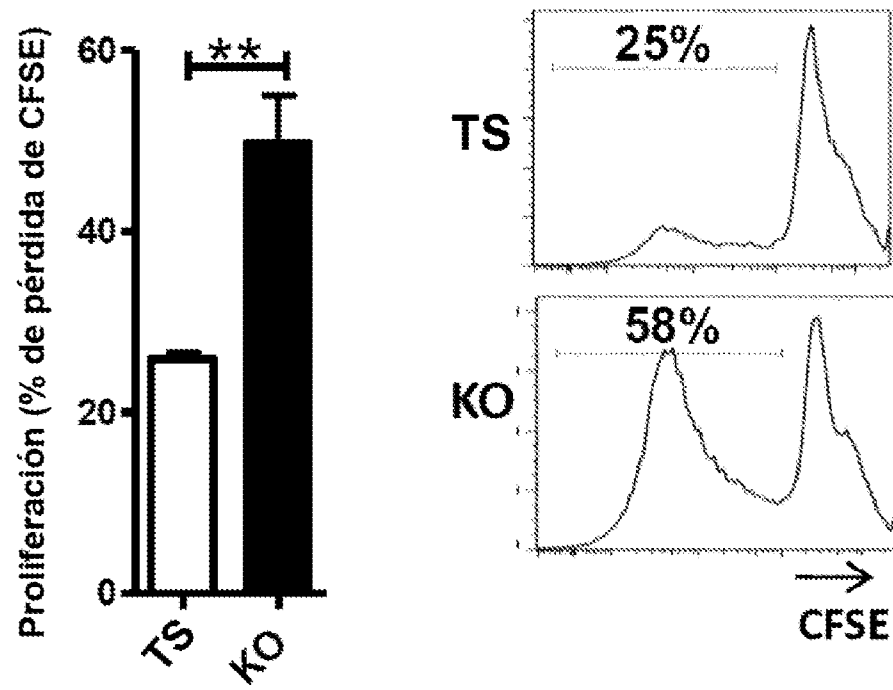


Figura 3

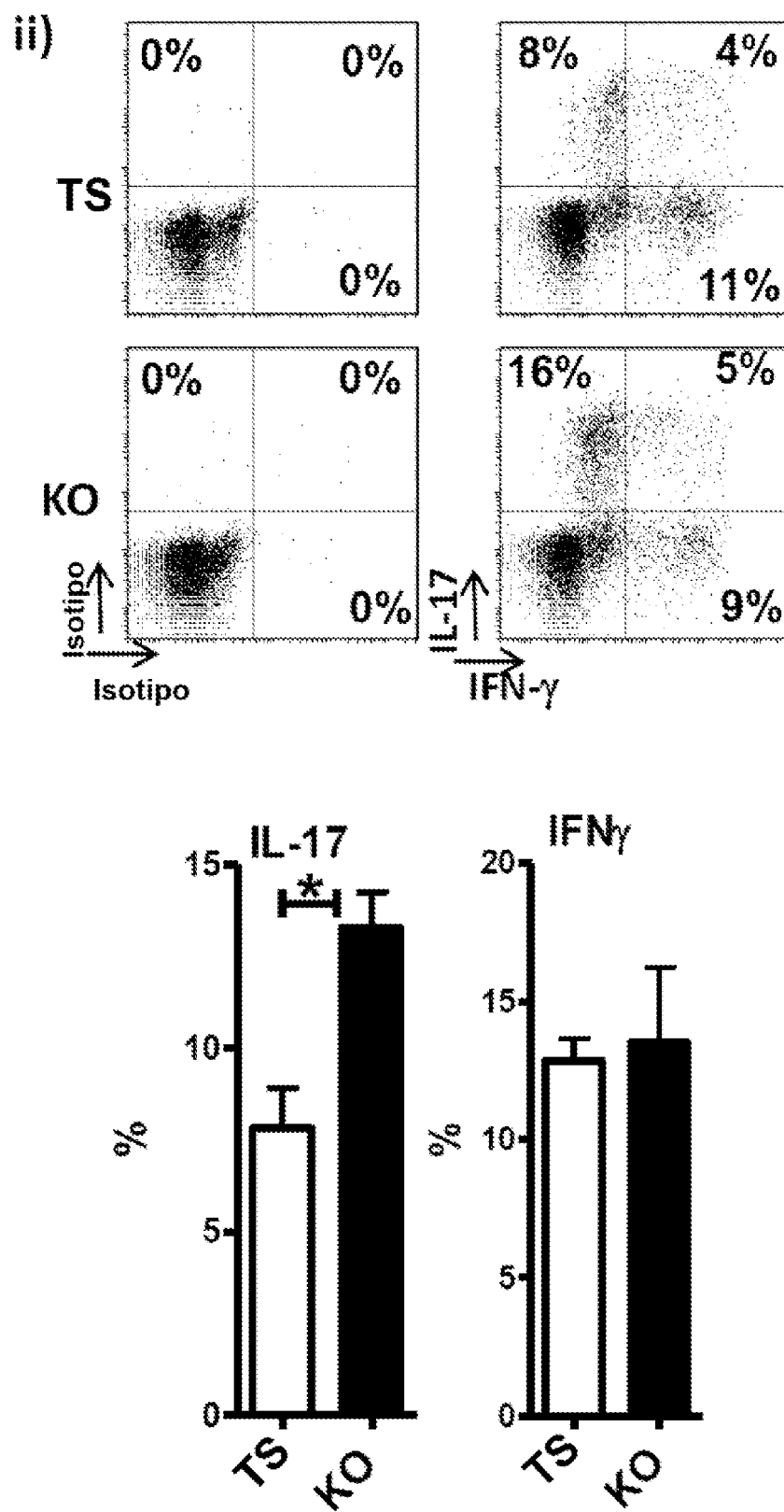


Figura 3 (segunda parte)

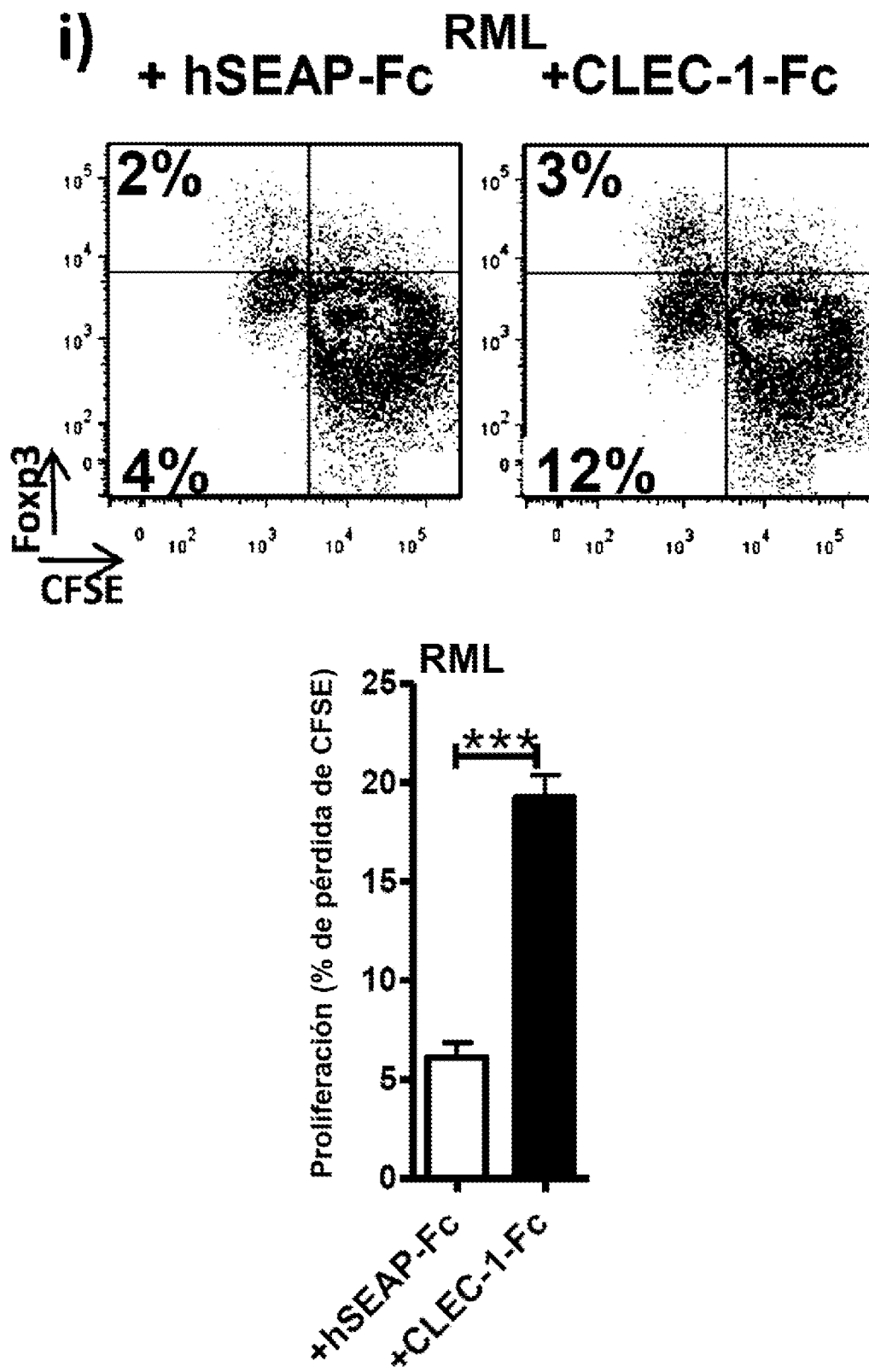


Figura 4

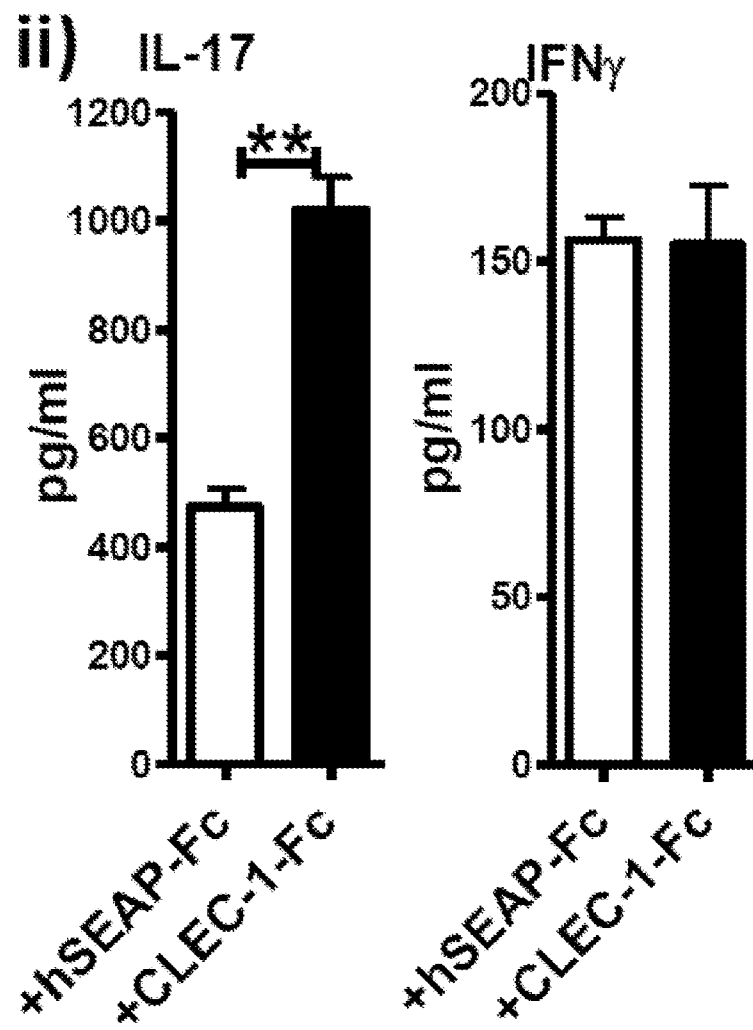


Figura 4 (segunda parte)

OLS de CDc de roedores

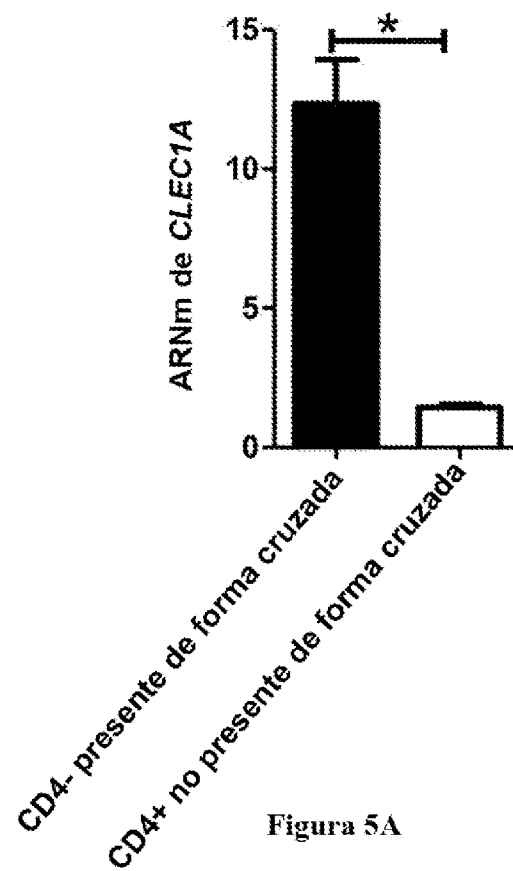


Figura 5A

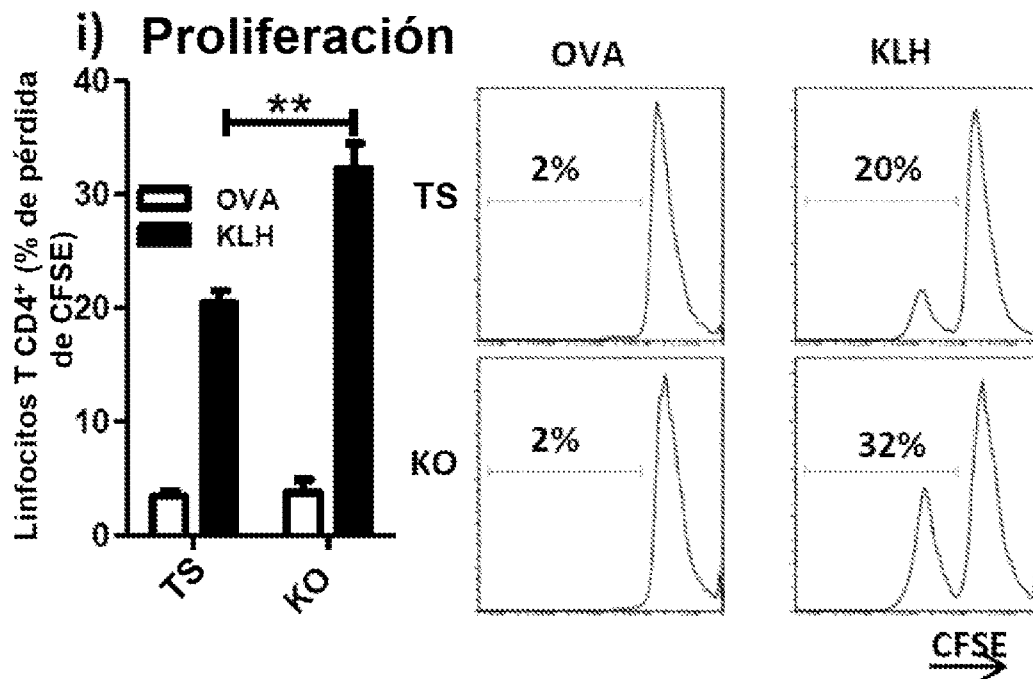


Figura 5B

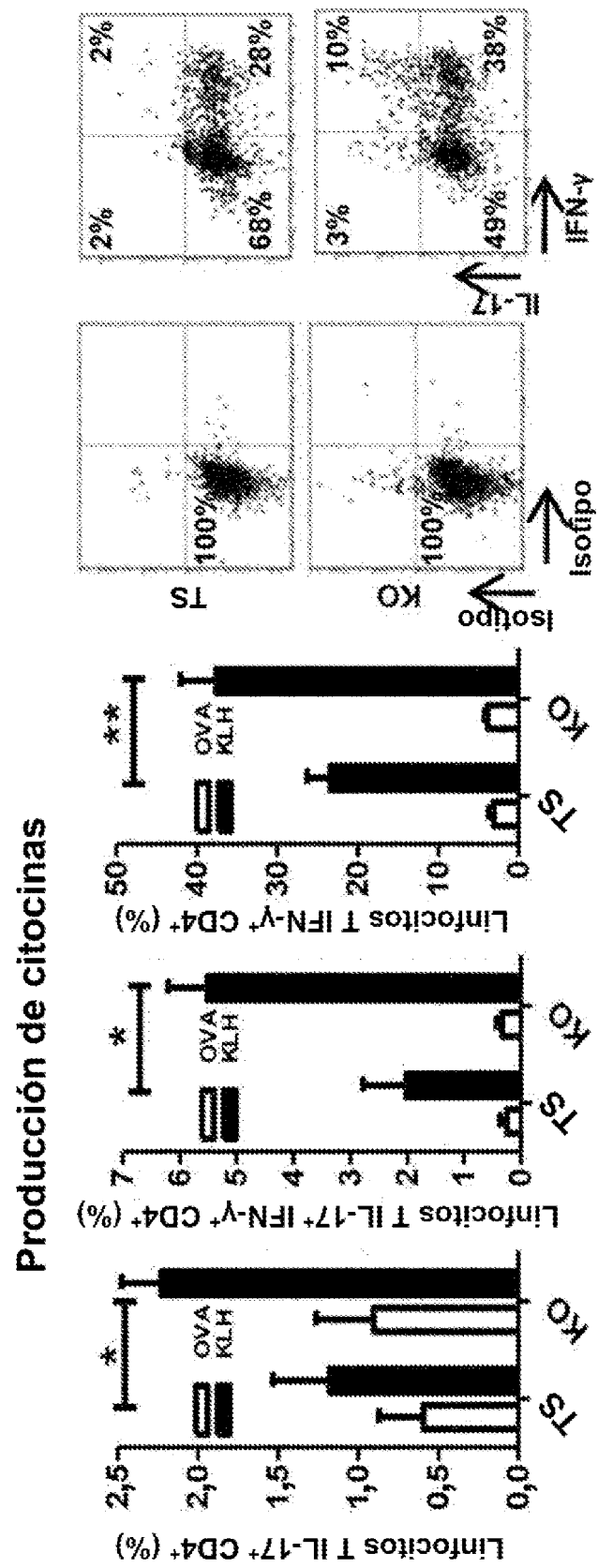


Figura 5B (segunda parte)

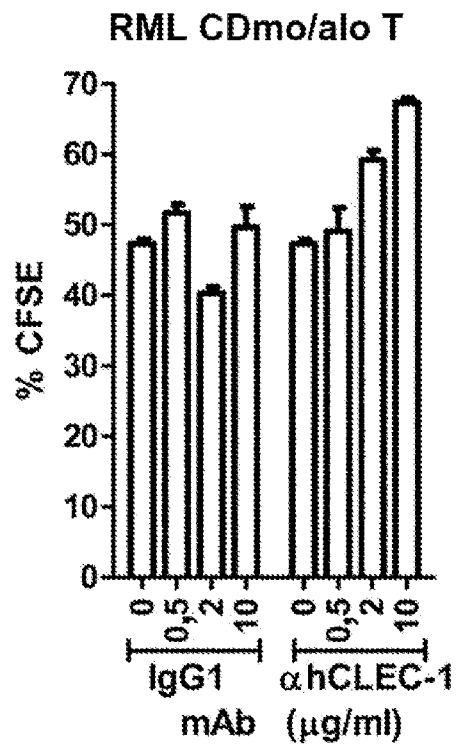


Figura 6A (parte 1/2)

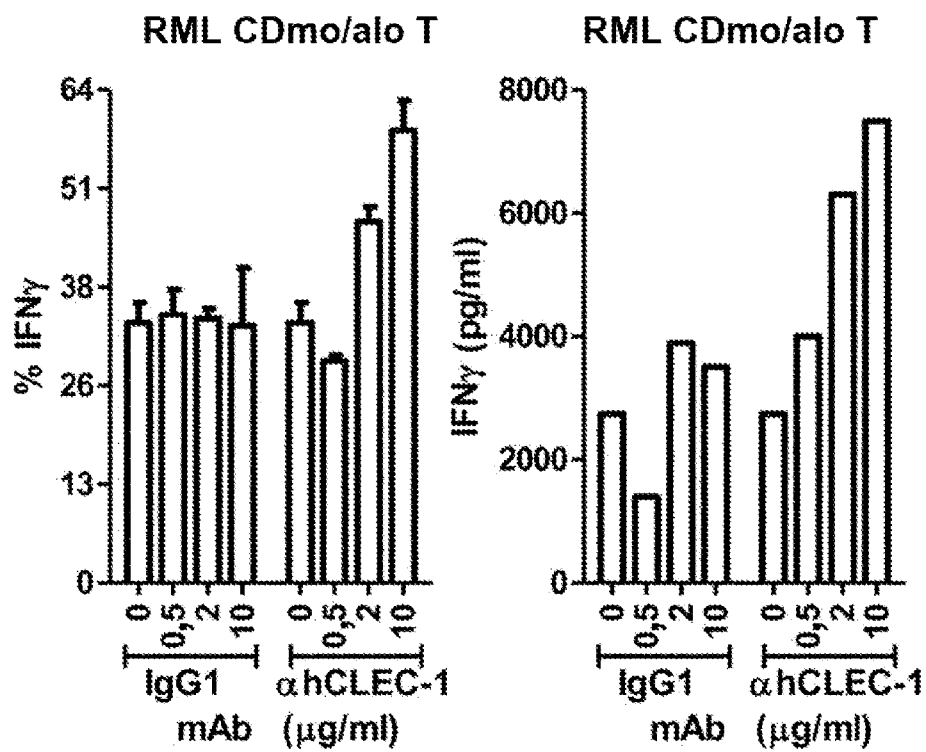


Figura 6A (parte 2/2)

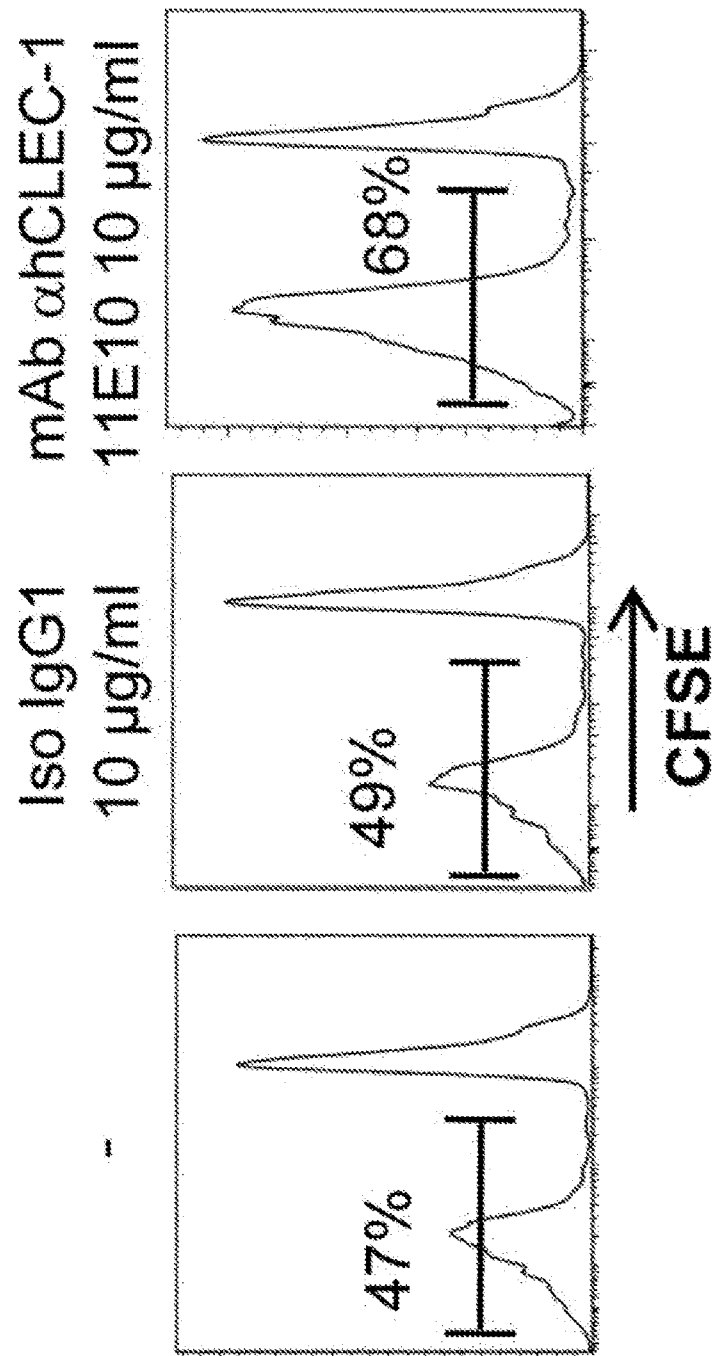


Figura 6B

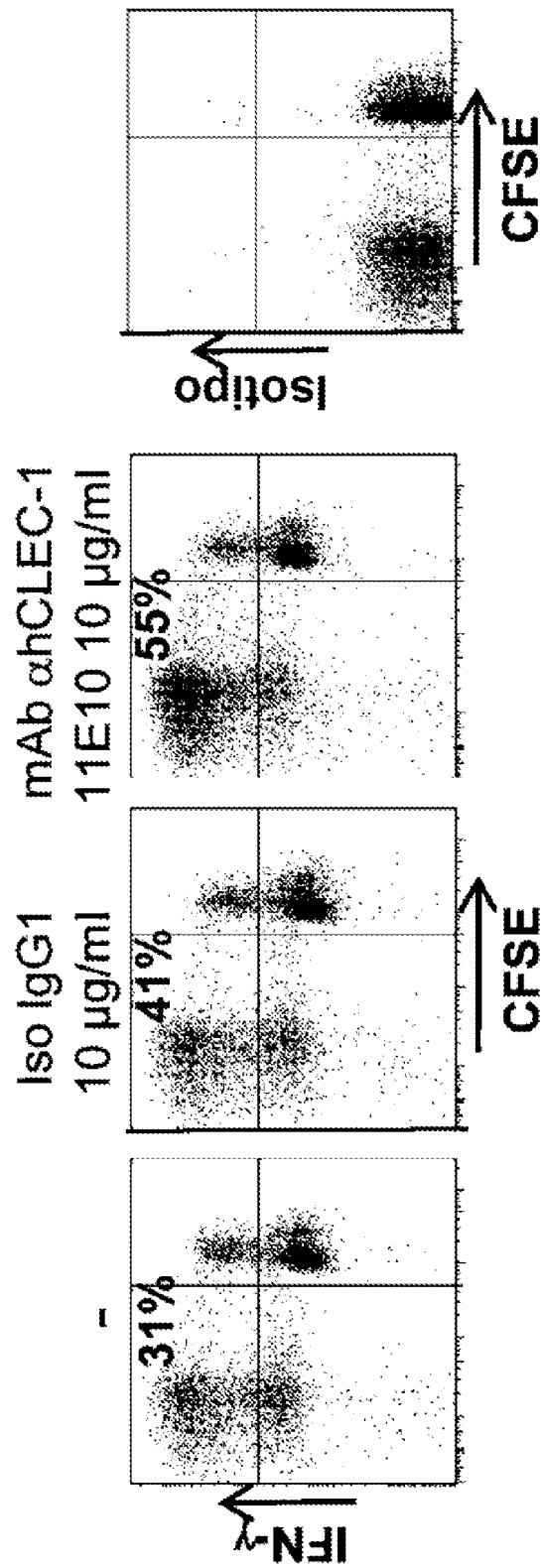


Figura 6C

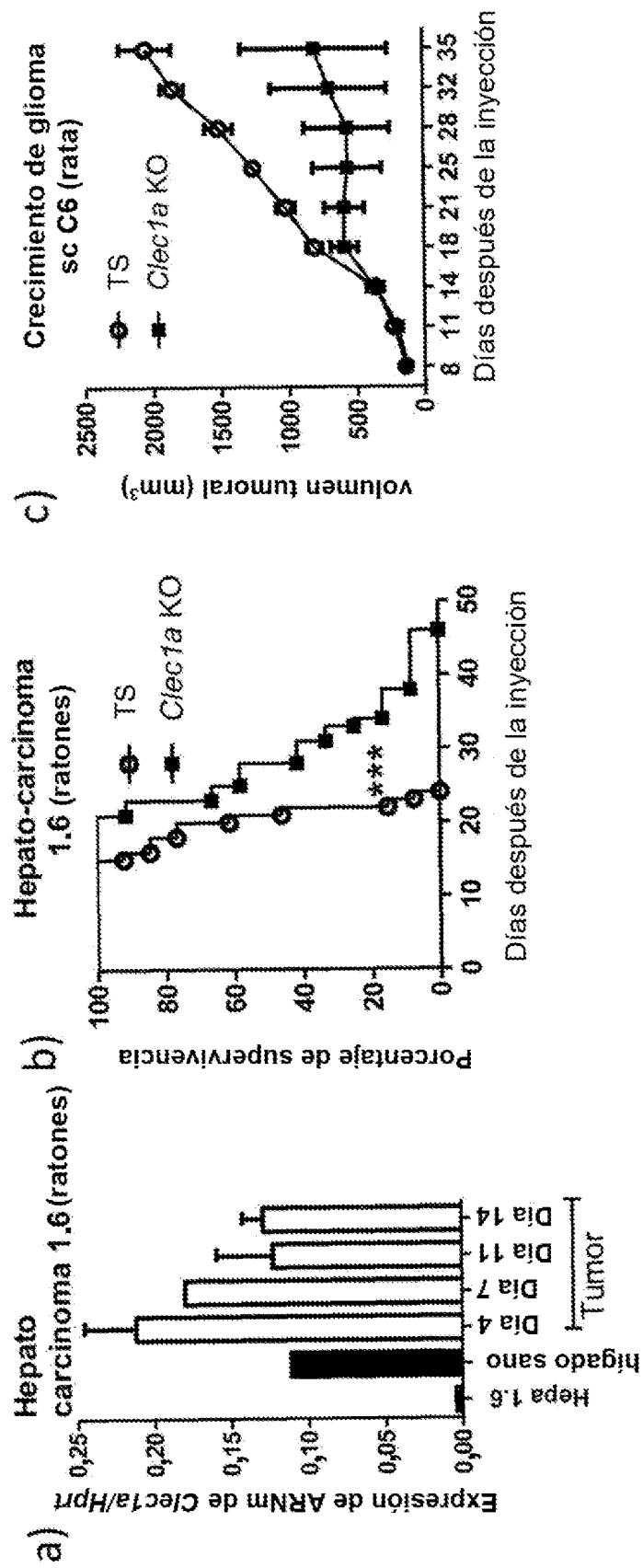


Figura 7

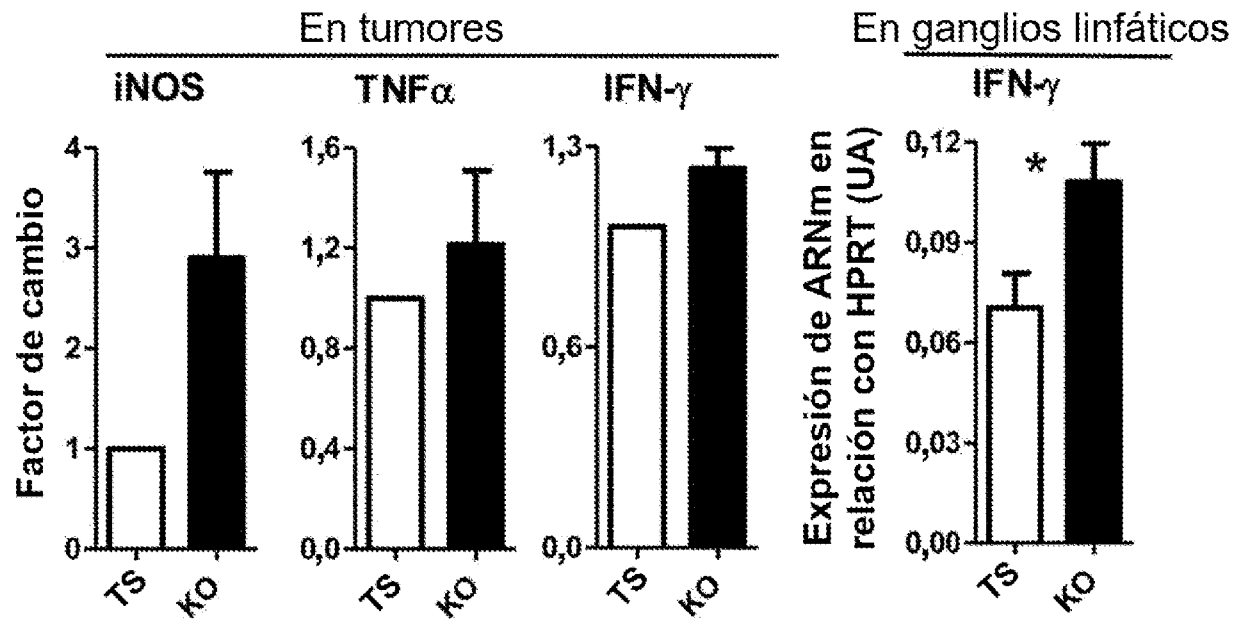
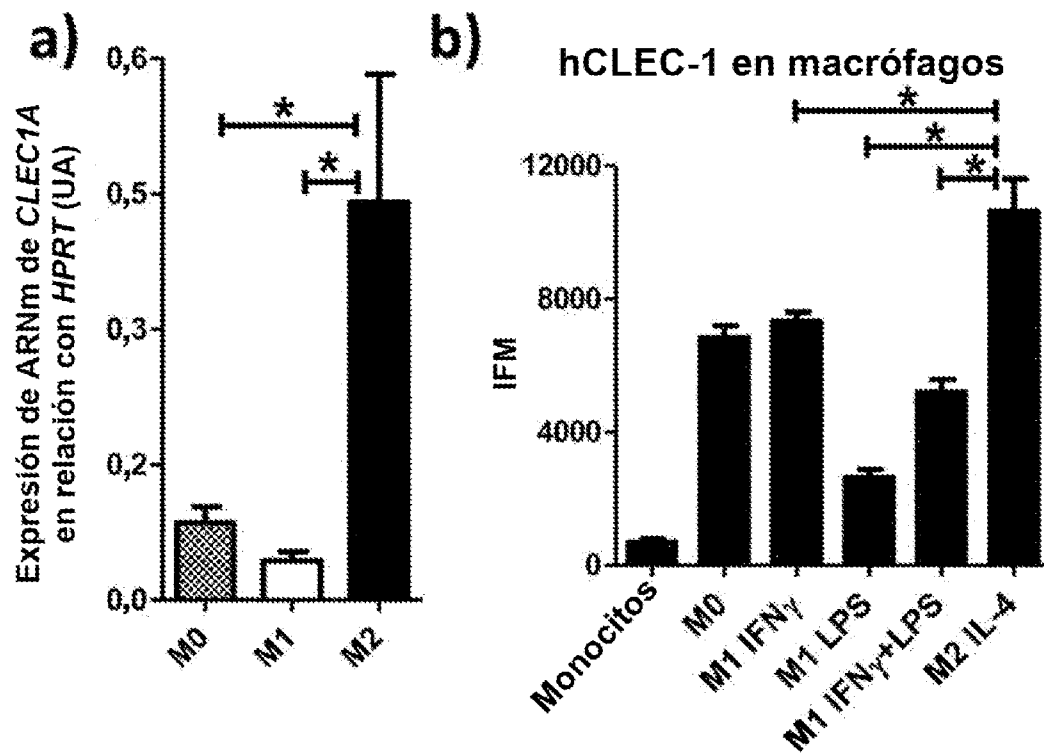


Figura 7d



Figuras 8A y 8B

c)

**mesotelioma
de efusiones pleurales h
En CD45 + HLA DR +**

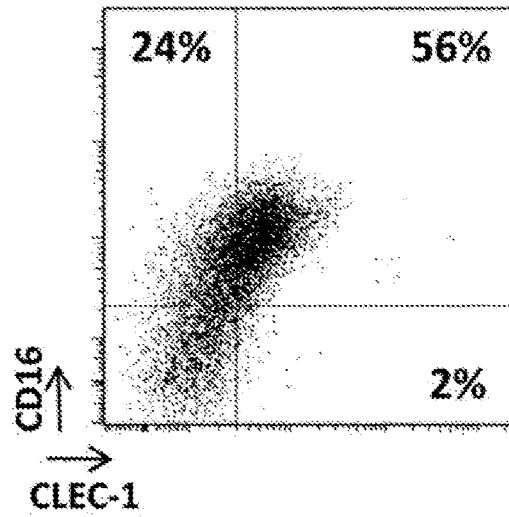


Figura 8C

d) ascitis de tumor ovárico h

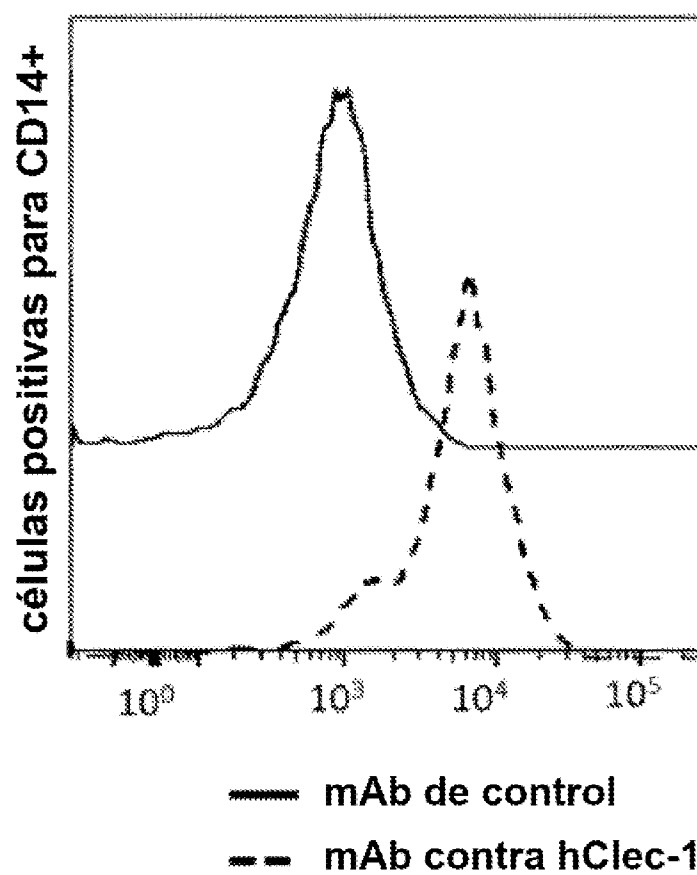


Figura 8D