



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118510534 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 16

(21) 申请号 202280088185.9

G • 特帕泽 E • 希福洛

(22) 申请日 2022.11.09

(74) 专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300

(30) 优先权数据

专利代理师 杜娟

21306571.7 2021.11.09 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2024.07.08

A61K 38/17 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 31/00 (2006.01)

PCT/EP2022/081332 2022.11.09

A61K 39/395 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61K 45/06 (2006.01)

W02023/083890 EN 2023.05.19

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 OSE免疫疗法

地址 法国南特市

申请人 南特大学 国立卫生和医学研究所

(72) 发明人 V • 高铁尔 C • 马里

权利要求书4页 说明书30页

N • 普瓦里耶 E • 威廉

序列表 (电子公布) 附图9页

(54) 发明名称

CLEC-1配体的识别及其用途

(57) 摘要

本发明涉及降低由CLEC-1/TRIM21相互作用诱导的信号通路的化合物的用途,特别是拮抗CLEC-1与TRIM21之间的相互作用(特别是结合)的化合物的用途,经识别的配体TRIM21用于为患者设计治疗方案的用途,经识别的配体TRIM21用于识别易与表达CLEC-1的细胞相互作用的细胞的用途,以及它们在治疗中的用途。

1. 化合物,所述化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂,特别是人CLEC-1与人TRIM21之间结合的拮抗剂,所述化合物用于治疗患有具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的人类受试者的用途。

2. 根据权利要求1所述的化合物,所述化合物用于权利要求1所述的用途,所述化合物与CLEC-1结合,特别是与人CLEC-1结合,或者所述化合物是多肽,所述多肽是CLEC-1的功能性等效物,特别是人CLEC-1的功能性等效物。

3. 根据权利要求1或2所述的化合物,所述化合物用于权利要求1或2所述的用途,其中,所述化合物抑制CLEC-1/TRIM21信号通路,所述化合物与CLEC-1结合,特别是与人CLEC-1结合,或者所述化合物降低功能性CLEC-1的表达,或者所述化合物是多肽,所述多肽是CLEC-1的功能性等效物。

4. 根据权利要求2或3所述的化合物,所述化合物用于权利要求2或3所述的用途,所述化合物与CLEC-1结合,特别是与人CLEC-1结合,更特别是与人CLEC-1的胞外结构域结合,所述化合物是抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物。

5. 根据权利要求4所述的化合物,所述化合物用于权利要求4所述的用途,所述化合物是嵌合抗体、人源化抗体、重组抗体、全人源化抗体、单克隆抗体、去免疫化抗体,特别是人源化单克隆抗体。

6. 根据权利要求4或5所述的化合物,所述化合物用于权利要求4或5所述的用途,所述化合物与具有SEQ ID No.10的重链可变结构域和SEQ ID No.11的轻链可变结构域的抗CLEC-1A抗体竞争结合CLEC-1,特别是竞争结合人CLEC-1。

7. 根据权利要求2或3所述的化合物,所述化合物用于权利要求2或3所述的用途,所述化合物是多肽,所述多肽是人CLEC-1的功能性等效物,特别地,所述多肽融合至免疫球蛋白恒定结构域。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的化合物,所述化合物用于权利要求1至7中任一项所述的用途,所述化合物增加髓样细胞、特别是树突状细胞和/或巨噬细胞的吞噬能力,特别是所述化合物增加树突状细胞和/或巨噬细胞对TRIM21阳性细胞、更特别是TRIM21阳性肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别是所述化合物增加树突状细胞和/或巨噬细胞对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的化合物,所述化合物通过增加对TRIM21阳性肿瘤细胞的吞噬作用而用于权利要求1至8中任一项所述的用途。

10. 化合物,所述化合物抑制C型凝集素样受体-1 (CLEC-1) /含三结构域基序蛋白21 (TRIM21) 信号通路,其中,所述化合物与TRIM21结合,或者所述化合物与参与CLEC-1/TRIM21信号通路的胞内分子结合,或者所述化合物降低功能性TRIM21的表达,或者所述化合物是TRIM21的功能性等效物,特别是,所述化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂,其与TRIM21结合,特别是与人TRIM21结合,所述化合物用作药物,特别是治疗受试者,特别是人类受试者,所述人类受试者患有癌症,特别是具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症、慢性感染、败血症,或患有感染(特别是柯萨奇病毒或脑炎病毒感染,更特别是柯萨奇病毒B3或日本脑炎病毒感染),或患有心血管疾病、自身免疫性疾病(特别是干燥综合征、系统性红斑狼疮或系统性硬化症),或患有炎性疾病。

11. 根据权利要求10所述的化合物,所述化合物用于权利要求10所述的用途,所述化合

物增加髓样细胞、特别是树突状细胞和/或巨噬细胞的吞噬能力,特别是所述化合物增加树突状细胞和/或巨噬细胞对TRIM21阳性细胞的吞噬作用,特别是所述化合物增加树突状细胞和/或巨噬细胞对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用、更特别是所述化合物增加树突状细胞和/或巨噬细胞对TRIM21阳性肿瘤细胞和/或TRIM21阳性继发性坏死细胞的吞噬作用。

12. 根据权利要求10或11所述的化合物,所述化合物用于权利要求10或11所述的用途,其中,所述受试者患有液体癌或实体癌,特别是淋巴瘤、白血病、结直肠癌、间皮瘤或肝癌。

13. 根据权利要求10至12中任一项所述的化合物,所述化合物用于权利要求10至12中任一项所述的用途,其中,所述受试者患有具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症。

14. 根据权利要求10至13中任一项所述的化合物,所述化合物用于权利要求10至13中任一项所述的用途,所述化合物是降低TRIM21表达的抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物、肽或多肽、核酸分子,特别是寡核苷酸分子,更特别是RNA分子、siRNA分子或miRNA分子,所述肽或多肽是TRIM21的功能性等效物。

15. 根据权利要求14所述的化合物,所述化合物用于权利要求14所述的用途,所述化合物是多肽,所述多肽是人TRIM21的功能性等效物,特别地,所述多肽融合至免疫球蛋白恒定结构域。

16. 根据权利要求10至14中任一项所述的化合物,所述化合物用于权利要求10至14中任一项所述的用途,其中,所述化合物是人CLEC-1与人TRIM21之间结合的拮抗剂,所述拮抗剂与人TRIM21结合。

17. 根据权利要求14或16所述的化合物,所述化合物用于权利要求14或16所述的用途,所述化合物与位于TRIM21的卷曲螺旋结构域、特别是位于SEQ ID No.2的TRIM21的氨基酸残基128和238之间的卷曲螺旋结构域内的表位序列结合,和/或所述化合物与位于TRIM21的PRY-SPRY结构域、特别是位于SEQ ID No.2的TRIM21的氨基酸残基268和465之间的PRY-SPRY结构域内的表位序列结合。

18. 根据权利要求14、16或17中任一项所述的化合物,所述化合物用于权利要求14、16或17中任一项所述的用途,所述化合物是嵌合抗体、人源化抗体、重组抗体、全人源化抗体、单克隆抗体、去免疫化抗体,特别是人源化单克隆抗体。

19. 根据权利要求10至13中任一项所述的化合物,所述化合物用于权利要求10至13中任一项所述的用途,所述化合物是抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物,所述化合物与TRIM21结合,所述化合物拮抗CLEC-1与TRIM21之间的结合,特别是人CLEC-1与人TRIM21之间的结合,其中,所述抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物与至少一种选自抗TRIM21抗体sc-25351、PA5-22294、PA5-18147和MAB-62191的竞争抗体竞争结合TRIM21,特别是竞争结合位于TRIM21的卷曲螺旋结构域内的连续氨基酸残基,特别是竞争结合位于SEQ ID No.2的TRIM21的氨基酸残基128和238之间的卷曲螺旋结构域内的连续氨基酸残基,和/或竞争结合TRIM21的PRYSPRY结构域内的连续氨基酸残基,特别是竞争结合位于SEQ ID No.2的TRIM21的氨基酸残基268和465之间的PRYSPRY结构域内的连续氨基酸残基,其中,所述抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物增强髓样细胞、特别是树突状细胞和/或巨噬细胞的吞噬能力,特别地,所述抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物增加树突状细胞和/或巨噬细胞对TRIM21阳性细胞、更特别是TRIM21阳性肿瘤细胞和/

或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别地,所述抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物增加树突状细胞和/或巨噬细胞对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用。

20. 根据权利要求10至19中任一项所述的化合物,所述化合物通过增加对TRIM21阳性细胞的吞噬作用而用于权利要求10至19中任一项所述的用途。

21. 化合物组合,所述化合物组合包含第一治疗剂和至少一种另外的治疗剂,其中:

i) 所述第一治疗剂是权利要求1至20中任一项所述的化合物;以及

ii) 所述至少一种另外的治疗剂选自肿瘤靶向抗体或其抗原结合片段,特别是肿瘤靶向单克隆抗体或其抗原结合片段,活化和/或增强髓样细胞、特别是巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用的肿瘤靶向单克隆抗体或其抗原结合片段,或更特别是选自以下的单克隆抗体:阿仑单抗、阿替利珠单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、赫塞汀、帕尼单抗、利妥昔单抗、曲妥珠单抗、抗PDL-1抗体和抗CD47抗体,和/或另一选自抗PD1抗体和抗SIRPa抗体的抗体或单克隆抗体;和/或化疗剂,特别是具有抗增殖、促凋亡、抑制细胞周期和/或诱导分化作用的细胞毒性剂,更特别是选自细胞毒性抗体、烷化药物、蒽环类药物、抗代谢物、抗微管剂、拓扑异构酶抑制剂、生物碱、博来霉素、抗肿瘤药物、环磷酰胺的细胞毒性剂。

22. 根据权利要求21所述的化合物组合,其中,所述第一治疗剂选自抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物,所述抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物与TRIM21结合,或者所述第一治疗剂是肽或多肽,或者是核酸分子,特别是寡核苷酸分子,更特别是RNA分子、siRNA分子或miRNA分子,所述第一治疗剂降低TRIM21的表达,所述肽或多肽是TRIM21的功能性等效物,特别是人TRIM21的功能性等效物。

23. 根据权利要求21所述的化合物组合,其中,所述第一治疗剂选自抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物,所述抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物与CLEC-1结合,或者所述第一治疗剂是肽或多肽,或者是核酸分子,特别是寡核苷酸分子,更特别是RNA分子、siRNA分子或miRNA分子,所述第一治疗剂降低CLEC-1的表达,所述肽或多肽是CLEC-1的功能性等效物,特别是人CLEC-1的功能性等效物。

24. 根据权利要求23所述的化合物组合,其中,所述第一治疗剂选自抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物,所述抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物与CLEC-1结合,所述抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物与具有SEQ ID No.10的重链可变结构域和SEQ ID No.11的轻链可变结构域的抗CLEC-1A抗体竞争结合CLEC-1,特别是竞争结合人CLEC-1。

25. 根据权利要求23所述的化合物组合,其中,所述第一治疗剂是多肽,所述多肽是CLEC-1的功能性等效物,特别地,所述多肽融合至免疫球蛋白恒定结构域。

26. 根据权利要求21至25中任一项所述的化合物组合,所述化合物组合用于同时、单独或依次用作药物,特别是用于治疗患有癌症的患者,所述患者特别是患有具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症、慢性感染、败血症、感染(特别是柯萨奇病毒或脑炎病毒感染,更特别是柯萨奇病毒B3或日本脑炎病毒感染)、心血管疾病、自身免疫性疾病(特别是干燥综合征、系统性红斑狼疮或系统性硬化症)、炎症疾病。

27. 用于选择化合物的方法,所述化合物调节、特别是增强或降低、更特别是抑制C型凝集素样受体-1(CLEC-1)/含三结构域基序蛋白21(TRIM21)信号通路,特别地,所述化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合、特别是人CLEC-1与人TRIM21之间结合的拮抗剂,所述方法包括:

a) 提供至少一种化合物并评估其(它们)干扰CLEC-1/TRIM21信号通路的能力,特别是干扰CLEC-1与TRIM21之间相互作用的能力,更特别是竞争或拮抗CLEC-1与TRIM21之间结合的能力,特别地,所述相互作用在CLEC-1与TRIM21的至少一个结构域之间确定;

b) 测量在化合物的存在下CLEC-1/TRIM21信号通路的活性和/或CLEC-1与TRIM21之间的结合;

c) 当化合物与阴性对照相比增强或降低了CLEC1/TRIM21信号通路的活性和/或在步骤b)中测量的结合时,识别出调节CLEC1/TRIM21信号通路的活性和/或CLEC-1与TRIM21之间结合的化合物,特别是识别出增强或降低CLEC-1与TRIM21之间相互作用的化合物。

28. 选择用于治疗具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的化合物的方法,所述方法包括进行权利要求27所述的方法,其中,选择降低了CLEC1/TRIM21信号通路的活性和/或CLEC-1与TRIM21之间结合的化合物。

29. TRIM21、特别是人TRIM21在体外测试中作为生物标记物用于评估用与CLEC-1或TRIM21结合的化合物治疗患有疾病的患者是否可能有效的用途,所述疾病特别是癌症,更特别是具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症,所述化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂。

30. 用于确定用抗TRIM21(特别是抗人TRIM21)化合物、抗CLEC-1(特别是抗人CLEC-1)化合物、TRIM21(特别是人TRIM21)的功能性等效物或CLEC-1(特别是人CLEC-1)的功能性等效物治疗患有疾病的患者是否可能有效的体外或离体方法,所述疾病特别是癌症,所述方法包括检测先前获自患者的生物样本中TRIM21的表达,当在所述生物样本中的细胞(特别是肿瘤细胞)表面和/或细胞(特别是肿瘤细胞)胞液内检测到TRIM21时,治疗可能具有有效性。

CLEC-1配体的识别及其用途

技术领域

[0001] 本发明基于CLEC-1蛋白的配体TRIM21的识别。本发明涉及降低由CLEC-1/TRIM21相互作用诱导的信号通路的化合物的用途,特别是拮抗CLEC-1与TRIM21之间的相互作用(特别是结合)的化合物的用途,还涉及经识别的配体TRIM21用于为患者设计治疗方案的用途,经识别的配体TRIM21用于识别易与表达CLEC-1的细胞相互作用的细胞的用途,以及它们在治疗中的用途。

[0002] 本发明还涉及检测CLEC-1与TRIM21相互作用的方法,以评估化合物对CLEC-1/TRIM21信号通路的拮抗能力,或筛选可以与CLEC-1或TRIM21结合的化合物,特别是可以竞争CLEC-1与TRIM21之间的结合的化合物。

背景技术

[0003] 治疗癌症的问题之一是在不损害健康组织的情况下消灭肿瘤细胞。近年来,治疗癌症的主要问题是在不损害健康组织的情况下靶向肿瘤细胞。在过去十年中,抗肿瘤免疫疗法受到越来越多的关注,因为这种疗法能重新引导患者的免疫系统来消灭癌细胞。已清楚地证明,肿瘤细胞利用免疫检查点以逃避免疫防御。抗体驱动的T细胞免疫检查点阻断所取得的巨大成功说明了这些抑制性检查点在阻碍抗肿瘤免疫中的关键作用。然而,通常在常规的化疗失败后,相当一部分患者对这些检查点抑制剂(CIK)疗法没有反应或产生耐药性。这些患者需要有效的新疗法,而髓样细胞是很有前景的治疗靶点。事实上,髓样细胞是最丰富的肿瘤浸润性免疫细胞。免疫细胞上表达的C型凝集素(CLEC)是环境传感器和免疫反应调节剂。CLEC-1代表了促进髓样细胞和抗肿瘤反应的潜在治疗靶点。为了更好地理解CLEC-1的功能并开发旨在调节其活性的化合物,需要识别其配体,特别是在肿瘤环境中的情况下。

[0004] CLEC-1(也称作CLEC-1A、CLEC1或CLEC1A)是一种C型凝集素样受体,即C型凝集素样受体-1,其主要在哺乳动物(更特别是在人类)中表达。更确切地,CLEC-1属于C型凝集素样受体(CTLR)的DECTIN-1簇,该簇还包括CLEC-2、DECTIN-1(CLEC7-A)、CLEC-9A、M1CL、MAH和LOX-1(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)。功能上,C型凝集素受体(CLR)是庞大的跨膜和可溶性受体家族,这些受体含有一个以上碳水化合物识别结构域,该碳水化合物识别结构域可以识别病原体或自我蛋白上的多种聚糖。对于这些受体,聚糖识别依赖于 Ca^{2+} 。尽管如此,许多相关的CLR仍可以识别碳水化合物,但不依赖于 Ca^{2+} ;这些受体被称为C型凝集素样受体(CTLR)。这些受体在先天性免疫和适应性免疫中的作用特别引人关注。CTLR主要由髓系的细胞表达,例如单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞(DC)和中性粒细胞。CTLR不仅可以作为内化并呈递给T细胞的抗原摄取受体,还能触发多种信号通路,导致NF- κ B、I型干扰素(IFN)和/或炎症小体的活化。通过它们呈递抗原并确保细胞活化与抑制之间平衡的能力,CTLR已成为治疗多种疾病(包括癌症、自身免疫性疾病或过敏)的具有

挑战性的药理靶点。CTLR调节似乎是一种具有前景的疾病管理策略,尽管迄今为止,人们仍在尝试识别配体并努力说明它们在免疫中的作用。

[0005] 众所周知,CLEC-1在髓样细胞和内皮细胞上表达。CLEC-1被描述为可以被免疫调节介体上调,并且可缓和T细胞的活化的受体(Thebault P.等人The C-Type Lectin-Like Receptor CLEC-1,Expressed by Myeloid Cells and Endothelial Cells,Is Up-Regulated by Immunoregulatory Mediators and Moderates T Cell Activation.J Immunol 2009;183:3099-3108)。发明人发现,CLEC-1在细胞表面由常规DC(cDC)以及人血液中的单核细胞和DC的小亚群表达,并由免疫抑制细胞因子TGF β 增强(参见国际申请号W02018073440)。他们证明了在啮齿类和人类中,CLEC-1在髓样细胞中作为抑制性受体,并且防止IL12p40的表达及下游Th1和Th17的体内反应(Lopez-Robles MD等人,Cell-surface C-type lectin-like receptor CLEC-1dampens dendritic cell activation and downstream Th17 responses Blood Adv.2017;Mar 22;1(9)557-568)。

[0006] 这些性质使人们有兴趣考虑将CLEC-1用于设计治疗涉及患者免疫反应的健康状况的其他方式,特别是用于开发抗癌的新疗法。特别地,这些结果要求进行另外的研究,以识别可能是该受体的内源性配体的表达化合物。内源性配体是指哺乳动物配体(特别是人配体),与外源性配体相反,外源性配体来自哺乳动物以外的不同物种。事实上,在病原性生物(即烟曲霉(*Aspergillus Fumigatus*))上识别到CLEC-1的外源性配体,该配体是1,8-二羟基萘(DHN)-黑色素的萘二醇单元(Stappers MHT等人Recognition of DHN-melanin by a C-type lectin receptor is required for immunity to *Aspergillus* Nature 2018Mar 15;555(7696):382-386)。已证明这种外源配体在小鼠或人类感染上述病原性真菌(fungus)的情况下存在。

[0007] 需要识别CLEC-1配体(特别是内源性配体),并确定与其结合的CLEC-1,以识别参与调节免疫反应的通路,或用于设计/识别调节免疫反应的化合物。

发明内容

[0008] 本发明依赖于对人细胞内源性CLEC-1配体的识别。本发明人识别到了TRIM21(含三结构域基序蛋白21)至少在人体内是CLEC-1的配体。本发明人已观察到TRIM21和CLEC-1可以在体外相互作用(即相互结合)。从RAJI细胞系的裂解物开始,本发明人能够纯化并识别可以与CLEC-1的功能性区域(Fc-CLEC1)相互作用(即结合)的蛋白质。本发明人还观察到,几种抗TRIM21抗体和抗CLEC-1抗体可以抑制TRIM21与CLEC-1之间的相互作用,因此是CLEC-1和TRIM21之间结合的拮抗剂。特别地,本发明人观察到,重组或融合分子特别地包括重组或融合多肽,其中,上述分子包含CLEC-1的胞外结构域,特别是人CLEC-1的胞外结构域(例如本文中说明的Fc-CLEC-1),可以与TRIM21结合,并且这种结合被几种抗TRIM21和抗CLEC-1抗体破坏。

[0009] 正如申请中将进一步详述的那样,本发明人提供的证据表明,CLEC1/TRIM21信号通路的拮抗作用导致髓样细胞(特别是巨噬细胞和/或树突状细胞)的吞噬能力显著提高,特别是其导致髓样细胞对TRIM21阳性细胞的吞噬能力增加,特别是导致树突状细胞和/或巨噬细胞对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞(更特别是对TRIM21阳性肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞)的吞噬能力增加。

[0010] 含有三结构域基序 (TRIM) 的蛋白都包含结构上保守的N末端,其具有真正有趣的新基因 (RING) 基序,该基序之后是一个或两个称为B盒 (B-box) 的锌指结构域和一个卷曲螺旋 (CC) 结构域。与其他家族成员一样,TRIM21由于其RING结构域是E3连接酶。作为TRIM家族的一员,TRIM21由五个结构域组成:RING、B盒、卷曲螺旋、PRY和SPRY (最后两个结构域通常在PRY-SPRY结构域内关联)。人TRIM21可具有SEQ ID No.2的氨基酸序列,并且RING、B盒、卷曲螺旋、PRY-SPRY结构域可分别位于氨基酸残基16和55、92和123、128和238、268和465之间。TRIM21通过它的E3连接酶功能来调节先天性免疫信号传导。它是与自身免疫性疾病 (例如系统性红斑狼疮和干燥综合征 (Sjögren's syndrome)) 相关的自身抗原。之前的研究 (Brauner等人,Journal of Internal Medicine,Vol.278(3),2015年9月,第323-332页) 表明,TRIM21可能在肿瘤发生发展中发挥作用,最近的研究则探讨了TRIM21表达与肿瘤预后之间的关系 (Ding,Q.,He,D.,He,K.等人.Downregulation of TRIM21 contributes to hepatocellular carcinoma carcinogenesis and indicates poor prognosis of cancers.Tumor Biol.36,8761-8772 (2015).<https://doi.org/10.1007/s13277-015-3572-2>)。TRIM21的高水平和低水平表达通常分别与好的预后和差的预后相关。本发明识别TRIM21是CLEC-1的配体后,由于CLEC-1涉及免疫反应,TRIM21可被视为开发新型治疗剂、新型诊断工具、预后因子和治疗因子 (特别是在治疗癌症或自身免疫性疾病方面) 以及TRIM21/CLEC1通路 (特别是相互作用方面) 的靶点。

[0011] 在第一方面,本发明涉及抑制C型凝集素样受体-1 (CLEC-1)/含三结构域基序蛋白21 (TRIM21) 信号通路的化合物,该化合物可用作药物,特别是用于治疗患有选自本说明书所列癌症的疾病的受试者 (特别是人类受试者),所述疾病特别是具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症,例如乳腺癌、肝细胞癌、淋巴瘤 (更特别是B细胞淋巴瘤)、结肠癌、甲状腺癌、肝癌、肾癌、黑色素瘤、结直肠癌、鼻咽癌、胰腺癌、慢性感染、败血症、感染、病毒感染 (特别是柯萨奇病毒或脑炎病毒感染,更特别是柯萨奇病毒B3或日本脑炎病毒感染)、真菌感染、心血管疾病、自身免疫性疾病 (特别是干燥综合征、系统性红斑狼疮或系统性硬化症)、炎性疾病。

[0012] 在另一方面,本发明涉及化合物,该化合物是CLEC-1与TRIM21 (特别是人CLEC-1与人TRIM21) 之间结合的拮抗剂,其与TRIM21结合,该化合物可用作药物,特别是用于治疗患有选自本说明书所列癌症的疾病的受试者 (特别是人类受试者),所述疾病特别是具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症,例如乳腺癌、肝细胞癌、淋巴瘤 (更特别是B细胞淋巴瘤)、结肠癌、甲状腺癌、肝癌、肾癌、黑色素瘤、结直肠癌、鼻咽癌、胰腺癌、慢性感染、败血症、感染 (特别是柯萨奇病毒或脑炎病毒感染,更特别是柯萨奇病毒B3或日本脑炎病毒感染)、真菌感染、心血管疾病、自身免疫性疾病 (特别是干燥综合征、系统性红斑狼疮或系统性硬化症)、炎性疾病。在优选实施方式中,患者患有癌症、败血症或慢性感染。

[0013] 在另一方面,本发明还涉及抑制C型凝集素样受体-1 (CLEC-1)/含三结构域基序蛋白21 (TRIM21) 信号通路的化合物的用途,该化合物用于增加髓样细胞 (特别是巨噬细胞和/或树突状细胞) 对细胞 (特别是TRIM21阳性细胞,特别是肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞,更特别是TRIM-21阳性肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞) 的吞噬作用。可使用的化合物包括与TRIM21或CLEC-1 (例如但不限于Fc-CLEC-1,特别是包含SEQ IDNo.3中所示的氨基酸残基的Fc-CLEC-1) 功能性等效的抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物、肽或多肽、降低TRIM21和/或CLEC-1的表达的核酸分子 (特别是寡核苷酸分子,更特别是RNA分子、siRNA分

子或miRNA分子)。

[0014] 在另一方面,本发明还涉及方法,在该方法中,CLEC-1与TRIM 21之间的相互作用用于评估用抗癌剂和/或用拮抗性抗人CLEC-1抗体或其抗原结合片段,或用拮抗性抗TRIM21抗体或其抗原结合片段治疗有效的可能性;用于筛选拮抗性化合物;用于治疗疾病。

[0015] 定义

[0016] 本文所用的术语“CLEC-1”和“CLEC-1A”与哺乳动物的CLEC-1A蛋白相关,优选人CLEC-1或CLEC-1A。人CLEC-1A受体的参考序列对应于与登录号Q8NC01 Uniprot相关的序列。优选地,术语“人CLEC-1”是指具有Q8NC01 Uniprot登录号的氨基酸序列并且由NCBI登录号为51267的CLEC-1基因编码的蛋白质。在本说明书中,术语CLEC-1A、CLEC-1、CLECA、CLEC-1、Clec1、Clec-1、CLEC-A1和Clec-1A可以互换使用,并且它们均指对应于人CLEC-1A受体的哺乳动物的CLEC1受体,它们的特征在于,与登录号Q8NC01 Uniprot相关的氨基酸序列、其直系同源蛋白或其同源蛋白。

[0017] 优选地,术语“人CLEC-1”是指具有Q8NC01 Uniprot登录号的氨基酸序列并且由NCBI登录号为51267的CLEC-1基因编码的蛋白质。在特别实施方式中,人CLEC-1的胞外结构域的氨基酸序列包含或由以下序列组成:

QYYQLSNTGQDTISQMEERLGNTSQELQSLQVQNIKLAGSLQHVAEKLCRELYNKAGAHRCSPCTEQW
KWHGDNCYQFYKDSKSWEDCKYFCLSENSTMLKINKQEDLEFAASQSYSEFFYSYWTGLLRPDSGKAWLWMDGTPF
TSELFHIIIDVTSPRSRDCVAILNGMIFSKDCKELKRCVCERRAGMVKPESLHVPETLGEGD (SEQ ID No.3)。

[0018] 本文所用的“CLEC-1的功能性等效物”,特别是“人CLEC-1的功能性等效物”是多肽、肽、寡肽、蛋白质,特别地,它们至少包含CLEC-1的胞外结构域的片段(或部分),也可能包含CLEC-1的胞外结构域,但条件是它不是完整的CLEC-1多肽。CLEC-1的胞外结构域的这种片段或CLEC-1的整个胞外结构域可以与另一分子(例如肽或另一蛋白质(例如抗体)的片段)结合,其稳定CLEC-1的胞外结构域或其片段的结构,从而提供融合蛋白,该融合蛋白至少包含CLEC-1的胞外结构域片段。这种CLEC-1的功能性等效物(特别是人CLEC-1的功能性等效物)或者可以是多肽、肽、寡肽、蛋白,它们的氨基酸序列与SEQ ID No.3所示的比对氨基酸序列具有至少80%,特别是至少90%的同一性(也称为SEQ ID No.3的变体)。

[0019] 特别地,CLEC-1的功能性等效物包含CLEC-1的胞外结构域,或包含与CLEC-1的胞外结构域(尤其是SEQ ID NO:3所示的序列)具有至少80%(特别是高于80%),特别是至少85%(特别是高于85%),至少90%(特别是高于90%),至少95%(特别是高于95%)的同一性的序列。

[0020] 特别地,CLEC-1的功能性等效物是人CLEC-1的功能性等效物,并且包含人CLEC-1的胞外结构域,或包含与人CLEC-1的胞外结构域具有至少80%(特别是高于80%),特别是至少85%(特别是高于85%),至少90%(特别是高于90%),至少95%(特别是高于95%)的同一性的序列,更特别是与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少80%(特别是至少或高于85%,至少或高于90%,至少或高于95%)的同一性的序列。

[0021] CLEC-1的功能性等效物,特别是人CLEC-1的功能性等效物可以包含例如CLEC-1的胞外结构域的片段或完整的胞外结构域或其变体,其与SEQ ID NO:3的序列中的比对氨基酸序列具有至少或高于80%,特别是至少或高于90%,特别是至少或高于95%的同一性,并且还包含连接肽、标记物、抗体的Fc部分。例如,Fc-CLEC-1可以包含SEQ ID NO:3所示的氨基

酸序列。例如, CLEC-1的功能性等效物可以是融合多肽。在特别实施方式中, 本发明的化合物是与免疫球蛋白恒定结构域融合的多肽, 该多肽是CLEC-1 (特别是人CLEC-1) 的功能性等效物。

[0022] 根据本发明的特别实施方式, 提供了融合分子, 其特征在于具有本文所定义的CLEC-1的功能性等效物。因此, 当用于靶向配体和/或免疫球蛋白恒定结构域 (Fc区域)、特别是人免疫球蛋白的恒定结构域以形成融合分子时, CLEC-1的胞外结构域可以与标记物 (例如包含氨基酸序列的标记物) 或适用于稳定CLEC-1的胞外结构域的部分融合, 该融合分子可以具有本文所定义的人抗体和/或接头的许多有价值的化学和生物学性质。

[0023] 在融合分子的特别实施方式中, Fc-CLEC-1融合分子中含有的人免疫球蛋白的Fc片段是人IgG1的Fc片段, 该Fc片段的N端与哺乳动物CLEC-1 (特别是人CLEC-1) 的胞外结构域融合。

[0024] 本文所用术语“TRIM21”具有本领域的一般含义, 是指含三结构域基序蛋白21, 特别是来自哺乳动物物种, 更特别是来自人TRIM21。

[0025] 优选地, 术语“人TRIM21”是指Uniprot登录号为P19474的氨基酸序列, 并且由Gene ID 6737 (NCBI登录号) 的TRIM21基因编码的蛋白质。在特别实施方式中, TRIM21具有SEQ ID No.2所示的氨基酸序列。特别地, TRIM21是CLEC-1的配体, 并且可以与CLEC-1结合 (例如, 当表达TRIM21的细胞具有渗透性时, 例如渗透性RAJI细胞, 或某种肿瘤细胞), 特别是与CLEC-1的胞外结构域结合, 特别是与SEQ ID No.1的CLEC-1结合。

[0026] 本文所用术语“TRIM21阳性细胞”、“TRIM21阳性肿瘤”和“TRIM21阳性肿瘤细胞”是指表达TRIM21蛋白的细胞或细胞群, 它们可以通过组成型表达 (例如, 由于细胞正常表达编码TRIM21蛋白的基因), 也可以通过诱导型表达 (例如, 由于外部刺激, 或细胞持续处于应激状态, 或持续处于凋亡通路等) 来表达TRIM21蛋白。

[0026] CLEC-1/TRIM21信号通路的拮抗剂

[0027] 在第一方面, 本发明涉及化合物, 该化合物是CLEC-1/TRIM21信号通路的拮抗剂, 即该化合物抑制CLEC-1/TRIM21信号通路。在本说明书中, 表述“是CLEC-1/TRIM21信号通路的拮抗性化合物”和“拮抗性化合物”可互换使用。CLEC-1/TRIM21信号通路包括任何参与细胞内化学反应以在CLEC-1与TRIM21相互作用后控制细胞功能的化合物。当CLEC-1与TRIM21相互作用时, 细胞从环境中接收信号, 该细胞表达CLEC-1化合物或TRIM21化合物。在通路中的第一个分子接收到信号后, 会活化另一个分子。这个过程在完整的信号通路中不断重复, 直到最后一个分子被活化, 得以进行细胞功能。CLEC-1/TRIM21信号通路的拮抗剂, 即抑制CLEC-1/TRIM21信号通路的化合物, 可对应于以下分子之一:

- 与TRIM21或CLEC1结合 (特别是特异性结合) 并拮抗TRIM21与CLEC-1之间结合分子; 或

- 降低细胞内TRIM21或CLEC1表达的化合物, 例如可以抑制TRIM21或CLEC1的表达或翻译为功能性蛋白的核酸分子, 例如但不限于能降低细胞内功能性TRIM21或CLEC1分子的表达的寡核苷酸分子, 更特别是RNA分子、siRNA分子或miRNA分子; 或

- TRIM21或CLEC-1的功能性等效物; 或

- 一种化合物, 其可以降低或抑制参与由CLEC-1与TRIM21之间的结合诱导的化学反应的化合物的能力, 以活化或抑制参与相同信号通路的另一种 (或多种) 不同的化合物。

[0028] 本发明也涉及使用其他能够拮抗在CLEC-1与TRIM21相互作用之后激活或抑制的信号通路的化合物。

[0029] 化合物对CLEC-1/TRIM 21通路的拮抗作用可通过测量髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对细胞(特别是TRIM21阳性细胞,更特别是肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞,更特别是TRIM21阳性肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞)的吞噬作用的增加(与阴性对照相比)来评估。

[0030] 在一个实施方式中,本发明涉及化合物,该化合物是CLEC-1与TRIM21之间(特别是人CLEC-1与人TRIM21之间)结合的拮抗剂,该化合物与TRIM21结合(特别是特异性地与TRIM21结合),该化合物用作药物,特别是用于治疗患有疾病的受试者(特别是人类受试者),所述疾病选自:癌症(特别是具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症),例如乳腺癌、肝细胞癌、淋巴瘤(更特别是B细胞淋巴瘤)、结肠癌、甲状腺癌、肝癌、肾癌、黑色素瘤、结直肠癌、鼻咽癌、胰腺癌、慢性感染、败血症、感染(更特别是柯萨奇病毒或脑炎病毒感染,更特别是柯萨奇病毒B3或日本脑炎病毒感染)、真菌感染、心血管疾病、自身免疫性疾病(特别是干燥综合征、系统性红斑狼疮或系统性硬化症)、炎性疾病。

[0031] 本文所用的,拮抗CLEC-1与TRIM21之间结合的化合物(在本说明书中也称为“拮抗剂”或“拮抗性化合物”)可指与TRIM21结合(特别是特异性地与TRIM21结合)的化合物、该化合物可选自:抗体、抗体的抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物、包含抗体的抗原结合片段或完全抗体的大分子、小分子有机化合物、多肽、肽、寡肽、蛋白质。或者,该化合物可以对应于TRIM21(特别是人TRIM21)的功能性等效物。该功能性等效物可以是多肽、肽、寡肽、蛋白质,特别是包含TRIM21的胞外结构域的至少一个片段。该片段可以与另一分子(例如多肽)或另一蛋白质的片段(例如抗体)结合,从而稳定TRIM21的胞外结构域的片段的结构,从而提供融合蛋白,该融合蛋白包含TRIM21的胞外结构域的至少一个片段。例如,该融合蛋白可以包含TRIM21的胞外结构域的片段和连接肽、标记物、抗体的Fc部分。在特别实施方式中,该化合物可以是CLEC-1(特别是人CLEC-1)的功能性等效物。该功能性等效物可以是多肽、肽、寡肽、蛋白质(特别是包含CLEC-1的胞外结构域的至少一个片段),或者可以是多肽、肽、寡肽、蛋白质,其氨基酸序列与SEQ ID No.3所示的对齐氨基酸序列具有至少或高于80%,特别是至少或高于85%,特别是至少或高于90%的同一性(所谓的变体)。该片段或变体可与另一分子(例如多肽)或另一蛋白质的片段(例如抗体)结合,从而稳定CLEC-1的胞外结构域的片段的结构,从而提供融合蛋白,该融合蛋白包含CLEC-1的胞外结构域的至少一个片段。例如,该融合蛋白可以包含CLEC-1的胞外结构域的片段和连接肽、标记物、抗体的Fc部分;例如,Fc-CLEC-1可以包含SEQ ID No.3所示的氨基酸序列。作为CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂的化合物是可以在体外、体内和/或离体降低、抑制或阻断CLEC-1与TRIM21之间相互作用的化合物。可使用本申请实施例中说明的方法来确定对CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗作用。换句话说,与TRIM21结合的、作为拮抗剂的化合物会负面干扰CLEC-1与TRIM21之间的相互作用,从而下调、降低或抑制由CLEC-1与TRIM21之间的相互作用诱导的信号通路。这种对CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗能力的存在与否,可以根据本发明的实施例(特别是实施例3)进行评估,如图5和图6所示,其中,公开了竞争测定法(competition assay),用于测量在抗TRIM21抗体存在时TRIM21与Fc-CLEC-1蛋白的结合。在优选实施方式中,本发明的拮抗性化合物与本文公开的CLEC-1或Fc-CLEC-1竞争与TRIM21的结合。相对于在相同

的实验条件下但不存在评估的本发明的拮抗剂时TRIM21与CLEC-1或Fc-CLEC-1的结合,当存在本发明的拮抗性化合物时TRIM21与CLEC-1或Fc-CLEC-1的结合低于90%、更优选低于80%,仍更优选低于50%,最优选低于20%,可以确定在TRIM21与本发明的拮抗性化合物和CLEC-1或Fc-CLEC-1之间的竞争测定法中存在拮抗能力。或者,可以根据本发明实施例中说明的方法确定对CLEC-1/TRIM21结合的拮抗能力。特别地,与不存在评估的化合物的相同结合实验相比,当其降低了CLEC-1的胞外结构域与TRIM21的结合(特别是降低了由人CLEC-1受体的胞外结构域与人免疫球蛋白(特别是人IgG)的Fc片段融合而成的融合蛋白与TRIM21的结合)时,与TRIM21结合的化合物可以被认为是CLEC-1与TRIM21(特别是人CLEC-1与人TRIM21)之间相互作用的拮抗剂。与对照实验相比,当结合降低至少1log,更特别是至少2log,最优选至少3log时,认为是降低。

[0032] 在本发明的一方面,拮抗性化合物与TRIM21结合,特别是特异性地与TRIM21,特别是与人TRIM21结合。换句话说,本发明的拮抗性化合物对其靶标TRIM21具有特异性亲和性。在本文公开的本发明的另一方面,拮抗性化合物与CLEC-1(特别是人CLEC-1)结合。换句话说,本发明的拮抗性化合物对其靶标CLEC-1具有特异性亲和性。术语“特异性结合”和“特异性地与…结合”“与…的特异性亲和性”指根据本发明使用的拮抗性化合物(特别是根据本发明的抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物或经修饰抗体)以至少 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以上的亲和力与TRIM21或分别与CLEC-1结合,和/或以至少对其非特异性靶(例如TRIM21以外的另一种蛋白质(如CLEC-1)或CLEC-1以外的另一种蛋白质(如TRIM21))高于两倍的亲和力与TRIM21或分别与CLEC-1结合。亲和性可根据本领域技术人员熟知的各种方法进行评估。这些方法包括但不限于生物传感器,例如Biacore分析、Blitz分析和Scatchard plot。

[0033] 拮抗性化合物可以是抗体、抗体的抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物、小有机化合物、肽、多肽、寡肽、蛋白质,特别是包含TRIM21氨基酸序列的一部分的肽或多肽,该氨基酸序列包含如SEQ ID No.2的序列中的连续氨基酸残基。拮抗性化合物也可以是RNA分子,特别是降低TRIM21蛋白表达的RNA分子,例如但不限于小干扰RNA、双链RNA、微小RNA(miRNA)以及具有干扰RNA干扰(RNAi)通路能力的RNA分子。这种RNA分子通过在trim21基因转录之后降解mRNA来干扰具有互补核苷酸序列的编码TRIM21的基因的表达,从而阻止其翻译为TRIM21蛋白。最优选的拮抗性化合物是抗TRIM21抗体。

[0034] 在本发明的特别实施方式中,化合物是抗体、抗体的抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物,其与位于TRIM21的卷曲螺旋结构域内的表位序列结合,特别是与位于SEQ ID No.2的TRIM21的氨基酸残基128和238之间的卷曲螺旋结构域或与对应于SEQ ID No.4的氨基酸残基的卷曲螺旋结构域内的表位序列结合,和/或其与位于TRIM21的PRY-SPRY结构域,特别是位于SEQ ID No.2的TRIM21的氨基酸残基268和465之间的PRY-SPRY结构域或与对应于SEQ ID No.5的氨基酸残基的PRY-SPRY结构域内的表位序列结合。在特定实施方式中,化合物是抗体、抗体的抗原结合片段,其与位于SEQ ID No.2的TRIM21的氨基酸残基141和280之间的表位序列结合,或与位于SEQ ID No.7所示的氨基酸序列内的表位结合。在特别实施方式中,化合物是抗体、抗体的抗原结合片段,其与位于SEQ ID No.2的TRIM21的氨基酸残基195和293之间的表位序列结合,或与位于SEQ ID No.8所示的氨基酸序列内的表位结合。在特别实施方式中,化合物是抗体、抗体的抗原结合片段,其与位于SEQ ID No.2的TRIM21

的氨基酸残基254和475之间的表位序列结合,或与位于SEQ ID No.6所示的氨基酸序列内的表位结合。在特别实施方式中,化合物是抗体、抗体的抗原结合片段,其与位于SEQ ID No.2的TRIM21的氨基酸残基463和475之间的表位序列结合,或与位于SEQ ID No.9所示的氨基酸序列内的表位结合。

[0035] 在本发明的特别实施方式中,化合物是抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物,其与TRIM21结合,特别是特异性地与TRIM21结合,并拮抗CLEC1与TRIM21之间的结合,特别是人CLEC-1与人TRIM21之间的结合,该抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物与至少一种选自抗TRIM21抗体sc-25351、PA5-22294、PA5-18147和MAB-62191的竞争抗体竞争结合TRIM21,特别是竞争结合位于TRIM21的卷曲螺旋结构域内的连续氨基酸残基,特别是竞争结合位于SEQ ID No.2的TRIM21的氨基酸残基128和238之间的卷曲螺旋结构域或与SEQ ID No.4的氨基酸的卷曲螺旋结构域内的连续氨基酸残基,和/或竞争结合TRIM21的PRY-SPRY结构域内的连续氨基酸残基,特别是竞争结合位于SEQ ID No.2的TRIM21的氨基酸残基268和465之间的PRYSPRY结构域或对应于SEQ ID No.5的氨基酸序列的PRY-SPRY结构域内的连续氨基酸残基。与竞争抗体相比,抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物增强髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对细胞(特别是TRIM21阳性细胞,特别是肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞)的吞噬作用。

[0036] 为了确定测试抗体是否可以竞争结合至少一种竞争抗体(所述竞争抗体选自抗TRIM21抗体sc-25351、PA5-22294、PA5-18147和MAB-62191)所结合的共同靶标,可以进行交叉阻断测定法(例如竞争性ELISA测定法)。在示例性竞争性ELISA测定法中,可以将多肽包被在微孔板的孔中,并与或不与候选竞争抗体一起预孵育,然后加入生物素标记的候选抗体,该多肽包含或由位于SEQ ID No.2的TRIM21的氨基酸残基128和238之间的卷曲螺旋结构域组成,或包含或由对应于SEQ ID No.4的氨基酸残基的卷曲螺旋结构域组成,和/或其与位于TRIM21的PRY-SPRY结构域内的表位序列结合,特别是与位于SEQ ID No.2的TRIM21的氨基酸残基268和465之间的PRY-SPRY结构域或对应于SEQ ID No.5的氨基酸残基的PRY-SPRY结构域内的表位序列结合。使用亲和素-过氧化物酶缀合物和适当的底物来测量与多肽结合的经标记的候选抗体的量。可以用放射性或荧光标记物或其他可检测和测量的标记物来标记抗体。与多肽结合的经标记的候选抗体的量与候选抗体竞争结合相同表位的能力间接相关,即候选抗体对靶标的亲和力越大,与多肽包被的孔结合的经标记的竞争抗体就越少。与不存在候选抗体(但可以存在已知的非竞争抗体)的情况下平行进行的对照相比,当候选抗体可以阻断至少20%,优选至少20-50%,甚至更优选至少50%的竞争抗体的结合时,该候选抗体被认为是与本发明的竞争抗体竞争结合相同多肽的抗体。应理解,可以改变这种测定法,以得到相同的定量的值。

[0037] 当然,根据竞争抗体的不同,板上包被的多肽可能会有所不同,以更接近地对应于竞争抗体识别的结构域。

[0038] 在本发明的特别实施方式中,化合物是抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物,其与TRIM21结合,特别是特异性地与TRIM21结合,并拮抗CLEC1与TRIM21之间的结合,特别是人CLEC1与人TRIM21之间的结合。该抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物与竞争抗体PA5-22294竞争结合SEQ ID No.6所示的氨基酸序列。与竞争抗体相比,该抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物增强髓样细胞对细胞(特别是TRIM21阳性细胞,特别

是肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞)的吞噬作用,特别是髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对TRIM21阳性肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用。

[0039] 在本发明的特别实施方式中,化合物是抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物,其与TRIM21结合,特别是特异性地与TRIM21结合,并拮抗CLEC1与TRIM2之间的结合,特别是人CLEC1与人TRIM21之间的结合。该抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物与竞争抗体sc-25351竞争结合SEQ ID No.7所示的氨基酸序列。与竞争抗体相比,该抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物增强髓样细胞对细胞(特别是TRIM21阳性细胞,特别是肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞)的吞噬作用,特别是树突状细胞和/或巨噬细胞对TRIM21阳性肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用。

[0040] 在本发明的特别实施方式中,化合物是抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物,其与TRIM21结合,特别是特异性地与TRIM21结合,并拮抗CLEC1与TRIM2之间的结合,特别是人CLEC1与人TRIM21之间的结合。该抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物与竞争抗体MAB6219竞争结合SEQ ID No.8所示的氨基酸序列。与竞争抗体相比,该抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物增强髓样细胞对细胞(特别是TRIM21阳性细胞,特别是肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞)的吞噬作用;特别是树突状细胞和/或巨噬细胞对TRIM21阳性肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用。

[0041] 在本发明的特别实施方式中,化合物是抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物,其与TRIM21结合,特别是特异性地与TRIM21结合,并拮抗CLEC1与TRIM2之间的结合,特别是人CLEC1与人TRIM21之间的结合。该抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物与竞争抗体PA5-18147竞争结合SEQ ID No.9所示的氨基酸序列。与竞争抗体相比,该抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物增强髓样细胞对细胞(特别是TRIM21阳性细胞,特别是肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞)的吞噬作用,特别是树突状细胞和/或巨噬细胞对TRIM21阳性肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用。

[0042] 术语“小有机化合物”包括与通常用于制药的有机分子大小相当的分子。该术语不包括生物大分子(例如蛋白质、核酸等)。优选的小分子有机物的尺寸范围是至多约5000Da,特别是至多2000Da,特别是至多约1000Da。

[0043] 本文所用术语“抗体”包括多克隆抗体、单克隆抗体(单抗)或重组抗体。本文所用的“单克隆抗体(单抗)”是指制备抗体分子以得到具有共同重链和共同轻链氨基酸序列的抗体,这与“多克隆”抗体制剂不同,“多克隆”抗体制剂含有不同的氨基酸序列的抗体的混合物。单克隆抗体可以通过例如噬菌体、细菌、酵母或核糖体展示的已知的技术以及以杂交瘤衍生抗体为例的经典方法制备。单克隆抗体还可以以公开的氨基酸序列为参考进行合成。因此,术语“单克隆”是指从一个核酸克隆衍生的所有抗体。

[0044] 本文所用术语“抗体”进一步是指与野生型抗体相比经过修饰的抗体,其包括嵌合抗体、人源化抗体、全人源化抗体、去免疫化抗体、经修饰的抗体和抗原结合抗体模拟物。在本发明的特别实施方式中,化合物是抗体或其抗原结合片段,其与TRIM21结合,特别是特异性地与TRIM21结合,并且包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4恒定区域。

[0045] 本发明的抗体包括重组抗体。本文所用术语“重组抗体”是指通过重组方法制备、表达、产生或分离的抗体,例如使用转染至宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体;从重组组合抗体库中分离的抗体;从因人类免疫球蛋白基因而转基因的动物(例如小鼠)中分离的

抗体;或以任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体,其中,特定的免疫球蛋白基因序列(例如人免疫球蛋白基因序列)与其他DNA序列组装在一起。重组抗体包括,例如嵌合抗体和人源化抗体。

[0046] 本文所用的“嵌合抗体”是指这样的抗体:来自哺乳动物物种(例如小鼠)种系的可变结构域的序列被移植到来自另一哺乳动物物种(例如人类)种系的恒定结构域的序列上。

[0047] 本文所用的“人源化抗体”在第一实施方式中是指这样的抗体:来自另一哺乳动物(例如小鼠)种系的CDR序列被移植到人或特别是人源化的框架序列上。在进一步实施方式中,“人源化抗体”是指这样的抗体:至少一个CDR和全部或部分框架序列已人源化。

[0048] 本文所用的“抗体的抗原结合片段”是指抗体的一部分,即对应于本发明抗体结构的一部分的分子,该片段(可能在其原生形式下)对TRIM21或CLEC-1具有抗原结合能力;与对应的四链抗体的抗原结合特异性相比,该片段特别地对该抗原具有相同或基本相同的抗原结合特异性。有利地,抗原结合片段与对应的四链抗体具有相似的结合亲和性。然而,与对应的四链抗体相比,抗原结合亲和性降低的抗原结合片段也包括在本发明中。可以通过测量抗体与靶片段之间的亲和性来确定抗原结合能力。这些抗原结合片段也可称为抗体的“功能性片段”。

[0049] 抗体的抗原结合片段是包含其超变结构域(命名为CDR(互补决定区域))或其部分的片段,其包含抗原(即TRIM21)识别位点。抗体的抗原结合片段含有包含该抗体的CDR的可变结构域,其包括Fv、dsFv、scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂。本发明的这些基本抗原结合片段可以组合在一起,以得到多价抗原结合片段,例如二抗体、三抗体或四抗体。这些多价抗原结合片段也是本发明的一部分。

[0050] 抗原结合抗体模拟物是特异性地与抗原结合的有机化合物,但在结构上与抗体无关。它们通常是摩尔质量为约3至20kDa的人工肽或小蛋白质。核酸和小分子有时也被认为是抗体模拟物,但其不包括人工抗体、抗体片段和由它们组成的融合蛋白。与抗体相比,抗体模拟物的共同优点是溶解性更好、组织穿透性更强、对热和酶更稳定,以及生产成本相对较低。抗体模拟物正被开发为治疗和诊断药物。抗原结合抗体模拟物也可从亲和体(affibody)、亲和素(affilin)、适配子(aptamer)、抗黄体素(anticalin)、亲和物(affimer)、亲和丁(affitin)、DARPin和单体(Monobody)中选择。

[0051] 本文中使用的术语“多肽”是指具有全部或任何长度的氨基酸残基的氨基酸的聚合物。因此,“多肽”的定义中包括肽、寡肽和蛋白质,这些术语在整个说明书和权利要求书中可以互换使用。术语“多肽”不排除翻译后的修饰,包括但不限于磷酸化、乙酰化、糖基化等。

[0052] 本文所用术语“功能等效片段”可指TRIM21或与TRIM21结合(特别是特异性地与TRIM21结合)的CLEC-1的任何片段或片段的组合。因此,本发明提供了多肽,特别是功能等效物,其可以降低/减少或抑制CLEC-1与TRIM21的结合,该多肽包括连续的氨基酸,其具有这样的序列:该序列是与CLEC-1结合的TRIM21的结构域的至少一部分的序列(针对TRIM21的功能等效物),或CLEC-1的胞外结构域的至少一部分的序列(针对CLEC-1的功能等效物),其部分与TRIM21结合,特别是特异性地与TRIM21结合。CLEC-1的功能等效物已如上定义,包括特别是SEQ ID No.3的氨基酸序列或其变体的CLEC1的胞外结构域的片段,该变体与SEQ ID No.3序列中的比对氨基酸序列具有至少或高于80%,特别是至少或高

于85%，特别是至少或高于90%的同一性。

[0053] 在一些实施方式中，功能性等效物融合至异源多肽，形成融合蛋白。本文所用的“融合蛋白”包括本发明的功能性等效物的全部或部分（通常具有生物活性），其与异源多肽（即相同的多肽以外的多肽）可操作连接。在融合蛋白中，术语“可操作连接”是指本发明的功能性等效物与异源多肽在框架内相互融合。异源多肽可以融合至本发明功能性等效物的N端或C端。

[0054] 在一些实施方式中，功能性等效物融合至免疫球蛋白恒定结构域（Fc区域），以形成免疫粘附素（immunoadhesin）。免疫粘附素具有人类抗体的许多有价值的化学和生物性质。由于免疫粘附素可以由具有所需特异性的人蛋白质序列与适当的人免疫球蛋白铰链和恒定区域（Fc）序列连接而构建，因此可以使用完全的人组分得到感兴趣的结合特异性。该免疫粘附素对患者的免疫原性极低，可安全地长期或重复使用。在一些实施方式中，Fc区域是原生序列Fc区域。在一些实施方式中，Fc区域是变体Fc区域。在另一实施方式中，Fc区域是功能性Fc区域。本文所用术语“Fc区域”用于定义免疫球蛋白重链的C端区域，其包括原生序列Fc区域和变体Fc区域。尽管免疫球蛋白重链的Fc区域的边界可能改变，但人IgG重链Fc区域通常被定义为从Cys226或Pro230位氨基酸残基延伸至其羧基末端。免疫粘附素的粘附部分和免疫球蛋白序列部分可以通过最小接头连接。免疫球蛋白序列通常（但不一定）是免疫球蛋白恒定结构域。本发明的嵌合体中的免疫球蛋白部分可以从IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型、IgA、IgE、IgD或IgM获得，但通常是IgG1或IgG4。在一些实施方式中，CLEC-1或TRIM21的功能性等效物与免疫粘附素的免疫球蛋白序列部分通过最小接头连接。本文所用的术语“接头”是指连接本发明的多肽和免疫球蛋白序列部分的至少一个氨基酸的序列。该接头可能有助于防止空间位阻。在一些实施方式中，接头具有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个氨基酸残基。不过，上限不重要，而是为了方便起见而选择的，为了便于例如此类多肽的生物制药生产。接头序列可以是天然存在的序列，也可以是非天然存在的序列。如果用于治疗目的，接头通常对施用免疫粘附素的受试者无免疫原性。一组有用的接头序列是WO 96/34103和WO 94/04678中描述的衍生自重链抗体的铰链区域的接头。其他的示例还有聚丙氨酸接头序列。

[0055] 在本发明的特别实施方式中，拮抗性化合物是TRIM21的功能性等效物。TRIM21的功能性等效物包括但不限于与CLEC-1结合并包含全部或部分TRIM21的分子，从而形成可以与CLEC-1结合的可溶性受体。这种TRIM21的功能性等效物可以是肽或多肽。特别地，这种TRIM21的功能性等效物可以是肽或多肽，其包含序列SEQ ID No.2内的至少20个，特别是至少25，特别是至少30个，特别是至少40个，特别是至少50个氨基酸残基，特别是至少80个氨基酸残基，特别是至少100个氨基酸残基，特别是至少200个氨基酸残基，特别是至少300个连续的氨基酸残基。或者，拮抗剂是肽或多肽，其包含至少20个氨基酸残基，特别是至少25个氨基酸残基，特别是至少30个氨基酸残基，特别是至少40个氨基酸残基，特别是50个氨基酸残基，特别是至少80个氨基酸残基，特别是至少100个氨基酸残基，特别是至少200个氨基酸残基，特别是至少300个氨基酸残基，并且与TRIM21或对应的蛋白质（特别是SEQ ID No.2的TRIM21）具有至少80%的同一性，更特别是至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%，更特别是至少99%的同一性，或具有100%的同一性。拮抗性化合物可以是

融合至免疫球蛋白恒定结构域的多肽,其包含或由氨基酸序列组成,该氨基酸序列与TRIM21或对应的蛋白质(特别是SEQ ID No.2的TRIM21)具有至少80%的同一性,特别是至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%,更特别是至少99%的同一性,或具有100%的同一性。本文所用的术语“对应的蛋白质”是指本文所定义的蛋白质,其具有与本发明的功能性等效物的相似的功能。本发明的说明中提到的同一性百分比是基于待比较序列的全局比对来确定的,也就是说,基于序列在其整个长度上的比对,使用例如Needleman和Wunsch 1970的算法确定的。例如,可以使用needle软件来进行序列比较,其中使用参数“Gap open”等于10.0、参数“Gap Extend”等于0.5以及矩阵“BLOSUM 62”。例如needle的软件在网站ebi.ac.uk上全球可用,名称为“needle”。

[0056] CLEC-1的功能性等效物包括但不限于与TRIM21结合的分子,该分子包含CLEC-1的全部或部分胞外结构域,从而形成可以与TRIM21结合的可溶性受体。因此,功能性等效物包括CLEC-1的可溶形式。蛋白质或其功能性等效物的适合的可溶形式可包括,例如,通过化学、蛋白水解或重组方法去除跨膜结构域的蛋白质的截短形式,并可包括或由本文所定义的CLEC-1的胞外结构域或其片段组成。特别地,功能性等效物由氨基酸序列组成,该氨基酸序列在对应的蛋白质的整个长度上与对应的蛋白质具有至少或高于80%的同一性,特别是至少或高于85%、至少或高于86%、至少或高于87%、至少或高于88%、至少或高于89%、至少或高于90%、至少或高于91%、至少或高于92%、至少或高于93%、至少或高于94%、至少或高于95%、至少或高于96%、至少或高于97%、至少或高于98%,更特别具有至少99%的同一性,特别是与比对氨基酸序列No.3具有至少或高于80%或至少或高于85%,特别是至少或高于90%的同一性。本文所用的术语“对应的蛋白质”是指蛋白质,其具有与本发明的功能性等效物的相似的功能。本发明的说明中提到的同一性百分比的参照是基于待比较序列的全局比对来确定的,也就是说,使用例如Needleman和Wunsch 1970的算法对整个长度的序列进行比对。例如,可以使用needle软件来进行序列比较,其中使用参数“Gap open”等于10.0、参数“Gap Extend”等于0.5以及矩阵“BLOSUM 62”。例如needle的软件在网站ebi.ac.uk上全球可用,名称为“needle”。

[0057] 可提供拮抗性化合物用作药物。特别地,可提供拮抗性化合物用于治疗受试者(即患者,特别是人类患者)的疾病,特别是用于患有癌症、败血症或传染性疾病的受试者。在另一实施方式中,拮抗性化合物可用于预防受试者的疾病的用途。本文所用的“治疗”是用于得到有益的或预期的结果的方法。有益的或预期的临床结果包括但不限于以下一项或多项:减轻、预防或消除由疾病引起的一种以上症状,治愈疾病,减轻疾病的程度,稳定疾病(例如、防止或延缓疾病恶化)、防止或延缓疾病扩散、防止或延缓疾病复发、延缓或减缓疾病进展、改善疾病状态、提供疾病(部分或全部)缓解、降低治疗疾病所需的一种以上其他药物的剂量、延缓疾病进展、提高生活质量和/或延长生存期。根据一个实施方式,术语“治疗”是指预防性治疗。本文所用的术语“防止”是指降低得到或患上某种病症的风险。

[0057] 在本发明的特别实施方式中,提供拮抗性化合物用于治疗患者的用途,其中,通过调节髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对靶细胞(特别是表达TRIM21的细胞,更特别是TRIM21阳性肿瘤细胞)的吞噬作用来改善疾病的治疗效果。因此,在特别实施方式中,提供拮抗性化合物,以增加髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对细胞(特别

是对TRIM21阳性细胞,更特别是肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞,甚至更特别是TRIM21阳性肿瘤细胞和/或TRIM21阳性继发性坏死细胞)的吞噬作用。因此,本发明的化合物可以靶向TRIM21阳性肿瘤(即包括至少一个表达(特别是异常表达)TRIM21的细胞的肿瘤)。事实上,已表明,TRIM21-CLEC1信号通路的拮抗剂(例如抑制CLEC-1与TRIM21之间的结合的、与TRIM21或CLEC1结合的化合物、TRIM21或CLEC1的功能性等效物,或降低功能性TRIM21或CLEC1表达的化合物,或者降低或抑制由TRIM21与CLEC-1之间的结合诱导的信号通路的化合物)可以调节(特别是增强)髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对靶细胞(例如表达TRIM21的肿瘤细胞)的吞噬作用,从而将其用于疗法或治疗疾病,其中,调节髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对靶细胞(例如表达TRIM21的肿瘤细胞或细胞)的吞噬作用改善了患者的健康状况。因此,使用TRIM21的拮抗性化合物,其至少降低了CLEC-1(在树突状细胞和巨噬细胞的细胞表面上表达)与其配体TRIM21(例如至少由肿瘤细胞表达)的相互作用,有助于调节髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对细胞(例如肿瘤细胞)的吞噬作用。当表达CLEC-1A的髓样细胞(特别是巨噬细胞或树突状细胞)与表达TRIM21的细胞相互作用时,可以抑制或降低这些巨噬细胞或树突状细胞的吞噬作用。例如,已表明,表达TRIM21的肿瘤细胞(即Raji细胞)可以逃避巨噬细胞的吞噬作用。通过使用本发明的拮抗性化合物来调节表达CLEC-1的髓样细胞与表达TRIM21的细胞(特别是TRIM21阳性肿瘤细胞)之间的相互作用,可以降低或抑制髓样细胞(特别是树突状细胞或巨噬细胞)对表达TRIM21的细胞的吞噬作用。因此,在本发明的拮抗性化合物存在的情况下,增强了对表达TRIM21的细胞(例如肿瘤细胞)的吞噬作用。

[0058] 更特别地,本发明涉及拮抗性化合物在患者病症或疾病的治疗中的用途,其中,该病症或疾病是本说明书中列出的癌症或与本说明书中列出的癌症相关,特别是具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症,例如乳腺癌、肝细胞癌、淋巴瘤(特别是B细胞淋巴瘤)、结肠癌、甲状腺癌、肝癌、肾癌、黑色素瘤、结直肠癌、鼻咽癌、胰腺癌、慢性感染、败血症、感染(特别是柯萨奇病毒或脑炎病毒感染,更特别是柯萨奇病毒B3或日本脑炎病毒感染)、心血管疾病、自身免疫性疾病(特别是干燥综合征、系统性红斑狼疮或系统性硬化症)、炎症疾病。

[0059] 术语“癌症”在本领域中具有一般含义,其指的是一组涉及细胞异常生长并有可能侵入或扩散到身体其他部位的疾病。术语“癌症”进一步包括原发性癌症和转移性癌症。可通过本发明的方法和组合物治疗的癌症的示例包括但不限于具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症、具有TRIM21阳性肿瘤的癌症、来自膀胱、血液、骨骼、骨髓、脑、乳腺、结肠、食道、胃肠道、牙龈、头部、肾、肝、肺、鼻咽、颈部、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌或子宫的癌症。此外,癌症可特异性地是以下组织学类型,但不限于这些类型:恶性赘生物;癌/恶性上皮肿瘤;未分化癌;巨细胞和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛发矩阵癌;过渡性细胞癌;乳头状过渡性细胞癌;腺癌;恶性胃泌素瘤;胆管癌;肝细胞癌;合并肝细胞癌和胆管癌;小梁腺癌;腺样囊性癌;腺瘤性息肉中的腺癌;腺癌,家族性结肠息肉病;实体癌;恶性类瘤癌;支气管肺泡腺癌;乳头状腺癌;嫌色细胞癌;嗜酸细胞癌;嗜氧细胞腺癌;嗜碱细胞癌;透明细胞腺癌;颗粒细胞癌;滤泡性腺癌;乳头状和滤泡性腺癌;非包膜性硬化癌;肾上腺皮质癌;子宫内膜癌;皮肤附属物癌;大汗腺癌;皮脂腺癌;耵聍腺癌;粘液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液性囊腺癌;粘液性囊腺癌;粘液性腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;小叶癌;炎性癌;乳腺帕吉特病(Paget's disease);腺泡

细胞癌;腺鳞癌;腺癌伴/鳞状化生;恶性胸腺瘤;恶性卵巢间质瘤;恶性泡膜细胞瘤;恶性颗粒细胞瘤;恶性巨细胞瘤;塞尔托利氏(Sertoli)细胞瘤;恶性莱迪希(leydig)细胞瘤;恶性脂质细胞瘤;恶性副神经节瘤;恶性乳腺外副神经节瘤;嗜铬细胞瘤;血管球瘤;恶性黑色素瘤;黑色素瘤;无黑色素黑色素瘤;浅表扩散黑色素瘤;巨型色素痣中的恶性黑色素瘤;上皮样细胞黑色素瘤;恶性蓝痣;肉瘤;纤维肉瘤;恶性纤维性组织细胞瘤;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎性横纹肌肉瘤;肺泡性横纹肌肉瘤;间质肉瘤;恶性混合瘤;穆勒氏(mullerian)混合瘤;肾母细胞瘤;肝母细胞瘤;癌肉瘤;恶性间质瘤;恶性布伦纳瘤(brennertumor);恶性叶状瘤;滑膜肉瘤;恶性间皮瘤;无性细胞瘤;胚胎癌;恶性畸胎瘤;恶性卵巢甲状腺瘤;绒毛膜癌;恶性中肾瘤;血管肉瘤;恶性血管内皮瘤;卡波济氏(kaposi's)肉瘤;恶性血管外皮细胞瘤;淋巴管肉瘤;骨肉瘤;皮质旁成骨肉瘤;软骨肉瘤;恶性软骨母细胞瘤;间叶性软骨肉瘤;骨巨细胞瘤;尤因氏(ewing's)肉瘤;恶性牙源性肿瘤;成釉细胞齿肉瘤;恶性成釉细胞瘤;成釉细胞纤维肉瘤;恶性松果体瘤;脊索瘤;恶性胶质瘤;室管膜瘤;星形细胞瘤;原浆性星形细胞瘤;纤维性星形细胞瘤;星形母细胞瘤;胶质母细胞瘤;少突胶质细胞瘤;成少突神经胶质细胞瘤;原始性神经外胚层瘤;小脑肉瘤;节细胞神经母细胞瘤;神经母细胞瘤;视网膜母细胞瘤;嗅神经源性肿瘤;恶性脑膜瘤;神经纤维肉瘤;恶性神经鞘膜瘤;恶性颗粒细胞瘤;恶性淋巴瘤;霍奇金病(Hodgkin's disease);霍奇金(Hodgkin's)淋巴瘤;副肉芽肿;恶性小淋巴细胞淋巴瘤;恶性弥漫性大细胞淋巴瘤;恶性滤泡性淋巴瘤;蕈状霉菌病;其他特定的非霍奇金(non-Hodgkin's)淋巴瘤;恶性组织细胞增生症;多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增生性小肠疾病;白血病;淋巴性白血病;浆细胞白血病、红白血病、淋巴肉瘤细胞白血病、骨髓性白血病、嗜碱性粒细胞白血病、嗜酸性粒细胞白血病、单核细胞性白血病、肥大细胞白血病、巨核细胞白血病、骨髓性肉瘤和毛细胞性白血病。

[0060] 在特别实施方式中,受试者患有的癌症选自以下:胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑和中枢神经系统癌症、乳腺癌、卡斯特曼病(Castleman disease)、宫颈癌、结直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胆囊癌、胃肠道类癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、卡波济氏肉瘤、肾癌、喉癌和下咽癌、肝癌、肺癌、间皮瘤、浆细胞瘤、鼻腔和鼻旁窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口腔和口咽癌、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、阴道癌、外阴癌和子宫癌。

[0061] 本发明还涉及化合物在治疗(包括预防性治疗)有害病症或疾病中的用途,特别是其中涉及树突状细胞和/或T细胞的病症或疾病,其中,T细胞的增殖和/或髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)的吞噬作用的刺激可改善或治疗该病症或疾病。在特别实施方式中,疾病或病症选自癌症,特别是如上列出的癌症,更特别是具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症、液体癌、实体癌、淋巴瘤、结直肠癌、间皮瘤或肝癌。

[0062] 在本发明的特别实施方式中,提供了化合物,该化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂,特别是人CLEC-1与人TRIM21之间结合的拮抗剂,用于治疗患有具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的人类受试者的用途。

[0063] 换句话说,在特别实施方式中,本发明涉及化合物,该化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂,特别是人CLEC-1与人TRIM21之间结合的拮抗剂,用于治疗具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症,特别是患有具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的人类受试者的用途。

[0064] 在特别实施方式中,用于治疗患有具有TRIM-1阳性肿瘤细胞的癌症的人类受试者或用于治疗具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的化合物与CLEC-1结合,特别是与人CLEC-1结合,特别是特异性地与CLEC-1结合,特别是特异性地与人CLEC-1结合,或者是如上定义的CLEC-1的功能性等效物,特别是人CLEC-1的功能性等效物,特别是多肽。

[0065] 在特别实施方式中,本发明涉及拮抗性化合物,该拮抗性化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂,通过增加特别是树突状细胞和/或巨噬细胞对TRIM21阳性肿瘤细胞的吞噬作用,用于治疗患有具有TRIM-1阳性肿瘤细胞的癌症的人类受试者,或用于治疗具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的用途。

[0066] 在特别实施方式中,用于治疗患有具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的患者的化合物特别是用于治疗选自以下的癌症:乳腺癌、肝细胞癌、淋巴瘤(特别是B细胞淋巴瘤)、结肠癌、甲状腺癌、肝癌、肾癌、黑色素瘤、结直肠癌、鼻咽癌、胰腺癌。

[0067] 本发明还涉及化合物在制备用于治疗患有具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的人类受试者的药物中的用途,该化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂,特别是人CLEC-1与人TRIM21之间结合的拮抗剂。

[0068] 本发明还涉及化合物在制备用于治疗具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的药物中的用途,该化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂,特别是人CLEC-1与人TRIM21之间结合的拮抗剂,特别是在患有具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的人类受试者中。该化合物如本文公开的任一实施方式中所定义。

[0069] 本发明还涉及用于治疗有需要的人类受试者中具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的方法,该方法包括向所述受试者施用有效量的化合物,该化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂,特别是人CLEC-1与人TRIM21之间结合的拮抗剂。该化合物如本文公开的任一实施方式中所定义。

[0070] 本发明还涉及用于治疗患有具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的人类受试者的方法,该方法包括向所述受试者施用有效量的化合物,该化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂,特别是人CLEC-1与人TRIM21之间结合的拮抗剂。该化合物如本文公开的任一实施方式中所定义。

[0071] 本发明还涉及用于增加特别是树突状细胞和/或巨噬细胞对TRIM21阳性细胞(特别是TRIM21阳性肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞)的吞噬作用的方法,该方法包括向有需要的患者施用有效量的本发明化合物,特别是其中,该化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂。该化合物如本文公开的任一实施方式中所定义。

[0072] 在本发明的另一特别实施方式中,提供了抑制C型凝集素样受体-1 (CLEC-1)/含三结构域基序蛋白21 (TRIM21) 信号通路的化合物,其中,该化合物与CLEC1结合(特别是特异性地与CLEC-1结合)、降低功能性CLEC1的表达或是CLEC1的功能性等效物(特别是多肽,该多肽是CLEC-1的功能性等效物),特别地,该化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗性化合物,该化合物与CLEC1结合,更特别是与人CLEC1结合,特别是与人CLEC-1特异性结合,在更特别的实施方式中,与人CLEC-1的胞外结构域特异性结合,用于治疗患有具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的受试者,特别是人类受试者的用途。优选地,该化合物增加髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)的吞噬能力,特别是增加树突状细胞和/或巨噬细胞对TRIM21阳性细胞(更特别是TRIM21阳性肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞)的吞噬作用,特别

是增加树突状细胞和/或巨噬细胞对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用。特别地,该化合物选自抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物,该化合物与CLEC-1结合,特别是与人CLEC-1结合,因此特别是特异性地与CLEC-1结合,该化合物是CLEC-1与TRIM21(特别是人CLEC-1与人TRIM21)之间结合的拮抗剂,其与具有SEQ ID No.10的重链可变结构域和SEQ ID No.11的轻链可变结构域的抗CLEC-1A抗体竞争结合CLEC-1,特别是竞争结合人CLEC-1,该化合物增强髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)的吞噬作用,特别是树突状细胞和/或巨噬细胞对TRIM21阳性细胞(更特别是TRIM21阳性肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞)的吞噬作用,更特别是树突状细胞和/或巨噬细胞对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用。

[0073] 在本发明的特别实施方式中,提供了选自抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物的化合物,该化合物与CLEC-1(特别是与人CLEC-1)结合,因此特别是特异性地与CLEC-1结合,该化合物是CLEC-1与TRIM21(特别是人CLEC-1与人TRIM21)之间结合的拮抗剂,它与具有SEQ ID No.10的重链可变结构域和SEQ ID No.11的轻链可变结构域的抗CLEC-1抗体竞争结合CLEC-1,特别是竞争结合人CLEC-1,特别地,该化合物增强髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)的吞噬能力,特别是树突状细胞和/或巨噬细胞对TRIM21阳性细胞(更特别是TRIM21阳性肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞)的吞噬作用,更特别是树突状细胞和/或巨噬细胞对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,用于治疗患有癌症的患者,特别是患有具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的患者。可治疗的癌症包括例如,乳腺癌、肝细胞癌、淋巴瘤(特别是B细胞淋巴瘤)、结肠癌、甲状腺癌、肝癌、肾癌、黑色素瘤、结直肠癌、鼻咽癌、胰腺癌。

[0074] 在本发明的特别实施方式中,提供了选自抗体、其抗原结合片段、抗原结合抗体模拟物的化合物,该化合物与CLEC-1结合,特别是与人CLEC-1结合,该化合物是CLEC-1与TRIM21(特别是人CLEC-1与人TRIM21)之间结合的拮抗剂,其与具有SEQ ID No.10的重链可变结构域和SEQ ID No.11的轻链可变结构域的抗CLEC-1抗体竞争结合CLEC-1,特别是竞争结合人CLEC-1,特别地,该化合物增强髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)的吞噬能力,特别是增强树突状细胞和/或巨噬细胞对TRIM21阳性细胞,特别是TRIM21阳性肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,特别是树突状细胞和/或巨噬细胞对肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞的吞噬作用,用于治疗患有具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的患者。

[0075] 本发明的工作实施例中提及的抗CLEC-1单抗#5(也称作 α CLEC-1#5)抗体具有SEQ ID No.10的重链可变结构域和SEQ ID No.11的轻链可变结构域。竞争结合CLEC-1可通过交叉阻断测定法(例如竞争性ELISA试验)进行评估。在示例性的竞争性ELISA测定法中,可将包含或由至少CLEC-1的胞外结构域组成的多肽包被在微孔板的孔中,并与或不与候选竞争抗体一起预孵育,然后加入经生物素标记的候选抗体。使用亲和素-过氧化物酶缀合物和适当的底物来测量与多肽结合的经标记的候选抗体的量。可以用放射性或荧光标记物或其他可检测和测量的标记物来标记抗体。与多肽结合的经标记的候选抗体的量与候选抗体竞争结合相同表位的能力间接相关,即候选抗体对靶标的亲和力越大,与多肽包被的孔结合的经标记的竞争抗体就越少。与不存在候选抗体(但可以存在已知的非竞争抗体)的情况下平行进行的对照相比,当候选抗体可以阻断至少20%,优选至少20-50%,甚至更优选至少50%的竞争抗体的结合时,该候选抗体被认为是与本发明的竞争抗体竞争结合相同多肽的

抗体。应理解,可以改变这种测定法,以得到相同的定量的值。

[0076] 当与CLEC-1 (特别是人CLEC-1) 结合 (特别是特异性地与人CLEC-1结合) 的化合物是抗体时,其可以是嵌合抗体、人源化抗体、重组抗体、全人源化抗体、单克隆抗体、去免疫化抗体,特别是人源化单克隆抗体。

[0077] 在特别实施方式中,本发明涉及化合物,该化合物是多肽,如本文公开的,该多肽是CLEC-1 (特别是人CLEC-1) 的功能性等效物,特别地,该多肽融合至免疫球蛋白的恒定结构域。

[0078] 药物组合物

[0079] 本发明还涉及用于治疗患有疾病的患者的药物组合物,该药物组合物包含作为治疗剂的如本文所定义的CLEC-1/TRIM21信号通路的拮抗剂,特别是与TRIM21结合的拮抗性化合物,特别是特异性地与TRIM21结合的拮抗性化合物,或根据本文公开的任何实施方式的CLEC-1A拮抗剂,该CLEC-1A拮抗剂是抗体或抗原结合片段或其抗原结合抗体模拟物,其与CLEC-1结合,因此特别是特异性地与CLEC-1结合。该治疗剂可以单独使用或者与第二种治疗剂以及药学上合适的载体组合使用,它们在药学上是可接受的,以便能够施用于有需要的患者。这些制剂特别可以是等渗的、无菌的盐水溶液(磷酸一钠或磷酸二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁等或这些盐的混合物),或者可以是干燥的,特别是冻干的组合物,根据具体情况,在加入灭菌水或生理盐水后,可以配制可注射的溶液。

[0080] 化合物组合

[0081] 本发明还涉及化合物组合,该化合物组合包含第一治疗剂和至少一种另外的治疗剂。

[0082] 化合物组合是制剂,该制剂包含至少两种不同的产品、制剂或化合物,它们可以包装在一起,也可以分开包装,用于同时给药、联合给药或配合给药(或依次给药)。特别地,组合中每种化合物的量可以是1 μ g/kg患者体重至100mg/kg患者体重。

[0083] 如本文公开的本发明任何实施方式中所定义,第一治疗剂是拮抗剂(即与TRIM21结合的拮抗剂,特别是特异性地与TRIM21结合的拮抗剂,例如本发明的实施方式中公开的抗体、其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物,其是降低或抑制TRIM21与CLEC-1相互作用后活化的信号通路的化合物,是降低TRIM21表达的化合物等)。

[0084] 至少一种另外的治疗剂选自肿瘤靶向抗体或其抗原结合片段,特别是肿瘤靶向单克隆抗体或其抗原结合片段,更特别是活化和/或增强髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)对肿瘤细胞或表达TRIM21的细胞的吞噬作用的肿瘤靶向单克隆抗体或其抗原结合片段,仍更特别是选自以下的单克隆抗体:阿仑单抗(alemtuzumab)、阿替利珠单抗(atenzolizumab)、贝伐单抗(bevacizumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、赫塞汀(herceptin)、帕尼单抗(panitumumab)、利妥昔单抗(rituximab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、抗PDL-1抗体和抗CD47抗体,或选自抗PD1抗体和抗SIRPa抗体的另一种抗体或单克隆抗体;和/或化疗剂,特别是具有抗增殖、促凋亡、抑制细胞周期和/或诱导分化作用的细胞毒性剂,特别是选自细胞毒性抗体、烷化药物、蒽环类药物、抗代谢物、抗微管剂、拓扑异构酶抑制剂、生物碱、博来霉素、抗肿瘤药物、环磷酰胺的细胞毒性剂。肿瘤靶向抗体可定义为治疗性单克隆抗体,其识别肿瘤特异性膜蛋白,阻断细胞信号传导,并通过Fc驱动的先发性免疫反应诱导肿瘤杀伤。化疗剂可以是常规的细胞毒性剂,即在暴露之后通过干扰DNA复制、有丝分裂等来

诱导不可逆的致死病变的化合物。这些制剂可以具有抗增殖、促凋亡、抑制细胞周期和诱导分化的作用。这些制剂优选选自烷化药物(顺铂、苯丁酸氮芥、甲基苄肼、卡莫司汀)、蒽环类药物和其他的细胞毒性抗生素、抗代谢剂(甲氨蝶呤、阿糖胞苷、吉西他滨(gemcitabine))、抗微管剂(即长春花碱(vinblastine)、紫杉醇、多西他赛)、拓扑异构酶抑制剂(即依托泊苷(etoposide)、阿霉素)、生物碱(即长春新碱(Vincristine)、长春花碱、长春瑞滨(Vinorelbine)、喜树碱)或博来霉素(抑制胸苷并入DNA链)。组合可包含选自该列表中的一种以上的第二治疗剂。组合还可进一步包含列表中未提及的其他治疗剂和/或组分,例如但不限于药用赋形剂或给药载体。

[0085] 在特别实施方式中,治疗剂可以在治疗疾病中同时、单独或依次给药。

[0086] 识别TRIM21为CLEC-1的配体

[0087] 据申请人所知,先前识别CLEC-1配体的方法只能允许识别CLEC1与坏死肿瘤细胞过表达的配体的相互作用,但不能识别该配体。申请人开发了创造性的方法,将TRIM21作为关键的内源性配体,该方法包括使用特定的非变性条件。

[0088] CLEC-1属于C型凝集素家族的一员。属于该家族的化合物能识别多种外源性和内源性配体,例如碳水化合物、蛋白质、脂质、DNA和核酸。先前尝试识别CLEC1的内源性配体时发现,在继发性坏死细胞中至少存在一种蛋白质性质的配体。然而,为识别CLEC-1的至少一种配体而开发的数种方法均没有发现任何有价值的配体。

[0089] 局限性首先在于配体的性质不确定。该挑战要求使用不同的实验条件和多种起始材料。需要对技术进行微调,以得到并保持不工作的传感器与由继发性坏死细胞释放的潜在易变配体之间的相互作用。在对几种识别CLEC-1配体的方法进行测试但均未成功之后,我们制定了解决方案,其中:1)对白细胞/活化单核细胞cDNA文库进行双杂交筛选;2)在预期含有CLEC-1配体的多种细胞提取物(MoDC、PBMC、K562细胞系)中,通过将固定在表面等离子体共振(Biacore)芯片上的一系列的多种CLEC-1融合蛋白进行配体捕获试验,并与保留的配体的质谱识别结合;3)在细胞内CLEC-1与其配体结合、交联和细胞蛋白的提取之后得到的细胞提取物上免疫沉淀CLEC-1。

[0090] 尽管作出了大量努力,但这些方法都没有识别出可以通过ELISA或Blitz进一步验证与CLEC-1的选择性相互作用的候选配体。因此,需要开发灵敏和具有选择性的方法来捕获、分离并识别已知在继发性坏死细胞和树突状细胞中表达的CLEC-1配体。

[0091] 申请人开发了不常见的化学温和的蛋白质提取方法,该方法基于低的洗涤剂浓度,与基于快速冷冻和解冻的机械约束结合,最大限度地打破细胞区室,在保持其翻译后修饰的同时从细胞中提取蛋白质。

[0092] 重点研究了观察到失去膜完整性后与CLEC-1结合的细胞(例如RAJI细胞系)。为了最大化CLEC-1与其内源性配体的结合,同时保持较低的非特异性结合,申请人建立了一种免疫沉淀方法,包括:

- 1) Fc-CLEC-1或Fc-对照与蛋白G微珠的直接结合;不使用任何中间抗体;
- 2) 使用磁性微珠,以最小化非特异性结合;
- 3) 仅在PBS中相互作用,除了细胞提取物中存在的低浓度洗涤剂以外,没有另外的洗涤剂;
- 4) 进行温和洗涤,不使用洗涤剂,仅用高浓度盐(最好是500mM NaCl)来以更高的

严格程度去除非特异性结合污染物;

5) 在室温下仅用DTT变性来洗脱结合的配体,以避免蛋白质(特别是糖蛋白)因受热而聚集。

[0093] 这种初始的方法可以从SDS-PAGE上的洗脱液中分离出离散的条带。质谱的分析表明,TRIM-21是内源性CLEC-1A配体,ELISA证实了其CLEC-1A的选择性相互作用。

[0094] 用于筛选CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂和激动剂的方法

[0095] 在另一方面,本发明涉及筛选化合物的方法,化合物包括但不限于小的有机化合物、抗体或其抗原结合片段、多肽(特别是人CLEC-1或人TRIM21的功能性等效物),特别是与TRIM21或CLEC-1结合并靶向(即干扰、降低、抑制或增强)CLEC-1/TRIM21信号通路的治疗剂,特别是竞争或拮抗CLEC-1与TRIM21之间结合的化合物,该方法包括:

a) 提供至少一种化合物并评估其(它们)干扰CLEC-1/TRIM21信号通路的能力,特别是干扰CLEC1与TRIM21之间相互作用的能力,更特别是竞争或拮抗CLEC-1与TRIM21之间结合的能力,其中特别地,确定Fc-CLEC-1融合分子与TRIM21的至少一个结构域(特别是全长TRIM21)之间的相互作用,或CLEC-1与TRIM21的至少一个结构域(特别是全长TRIM21)之间的相互作用;

b) 测量在化合物的存在下CLEC1/TRIM21信号通路的活性和/或CLEC-1与TRIM21之间的结合;

c) 当化合物与阴性对照相比增强或降低了CLEC1/TRIM21信号通路的活性和/或在步骤b)中测量的结合时,识别出调节CLEC1/TRIM21信号通路的活性和/或CLEC-1与TRIM21之间结合的化合物,特别是识别出增强或降低CLEC-1与TRIM21之间相互作用的化合物。

[0096] 可通过测量在化合物存在时髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)的吞噬能力,并将结果与化合物不存在时的结果进行比较,来评估步骤b)中的测量。髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)的吞噬能力可以在TRIM21阳性细胞(特别是TRIM21阳性肿瘤细胞或继发性坏死细胞,特别是肿瘤细胞或继发性坏死细胞)上进行评估。

[0097] 在另一方面,本发明涉及筛选化合物的方法,化合物包括但不限于小的有机化合物、抗体或其抗原结合片段、多肽(特别是人CLEC-1或人TRIM21的功能性等效物),特别是与TRIM21或CLEC-1结合并靶向(即干扰、降低或抑制)CLEC-1与TRIM21之间结合的治疗剂,特别是竞争、拮抗或激动CLEC-1与TRIM21之间结合的化合物,该方法包括:

a) 提供至少一种化合物并评估其(它们)干扰CLEC-1与TRIM21之间结合的能力,特别是竞争或拮抗CLEC-1与TRIM21之间结合的能力,特别是确定CLEC-1与TRIM21的至少一个结构域之间的相互作用;

b) 情况是,分离和/或识别出调节CLEC-1与TRIM21之间相互作用(例如结合)的化合物,特别是分离和/或识别出增强或降低CLEC-1与TRIM21之间相互作用的化合物。

c) 可选地,测试调节CLEC-1与TRIM21之间相互作用(例如结合)的化合物与TRIM21(特别是人TRIM21)和/或CLEC-1(特别是与人CLEC-1)的结合能力。

[0098] 本发明还涉及选择用于治疗具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症的化合物的方法,该方法包括进行本文所述的筛选化合物的方法,其中,选择降低CLEC1/TRIM21信号通路活性和/或CLEC-1与TRIM21之间结合的化合物。

[0099] 特别地,选择与TRIM21结合(特别是特异性地与TRIM21结合)并且拮抗CLEC-1与

TRIM21之间(特别是人CLEC-1与人TRIM21之间)结合的拮抗剂的方法可包括以下步骤:

- a) 提供TRIM21蛋白或其部分,其包含至少一个选自RING、B盒、卷曲螺旋、PRY、PRYSPRY和SPRY的TRIM21结构域,以及提供CLEC-1蛋白或其部分,其包含CLEC-1的胞外结构域,特别是Fc-CLEC-1,更特别是包含SEQ ID No.3的Fc-CLEC-1;
- b) 提供化合物,测试其拮抗CLEC-1与TRIM21之间结合的能力;
- c) 测量在化合物存在时CLEC-1与TRIM21之间的结合;
- d) 可选地,测量化合物与TRIM21(特别是人TRIM21)的结合,和/或测量化合物与CLEC-1(特别是与人CLEC-1)的结合;

[0100] 当化合物与阴性对照相比降低了在步骤c)中测量的结合时,该化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂;当在步骤d)中测量的化合物与TRIM21的结合高于与CLEC-1的结合时(特别是当化合物与TRIM21的亲合性是其与CLEC-1的亲合性的至少两倍时),该化合物进一步特异性地与TRIM21结合。

[0101] 阴性对照可以对应于相似性质的化合物(例如,抗体(当测试的化合物是抗体时)、有机分子(当测试的化合物是有机分子时)),已知其不干扰CLEC-1与TRIM21之间的结合,例如,因为对照既不结合也不干扰TRIM21与CLEC-1这两种分子中的一种或两种。

[0102] 本发明还涉及用于选择与TRIM21结合(特别是特异性地与TRIM21结合)并且拮抗CLEC-1与TRIM21(特别是人CLEC-1与人TRIM21)之间结合的化合物的方法,该方法包括:

- a) 提供至少一种化合物,用于测试其与TRIM21结合并干扰CLEC-1与TRIM21之间相互作用的能力,特别是竞争或拮抗CLEC-1与TRIM21之间结合的能力,其中特别地,确定包含CLEC-1的胞外结构域的多肽或肽与TRIM21的至少一个结构域(特别是全长TRIM21)之间的相互作用,或Fc-CLEC-1融合分子与TRIM21的至少一个结构域(特别是全长TRIM21)之间的相互作用,特别是确定CLEC-1与TRIM21的至少一个结构域(特别是全长TRIM21)之间的相互作用;

- b) 测量在化合物的存在时CLEC-1与TRIM21之间的相互作用(例如结合);

- c) 当化合物与阴性对照相比增强或降低了在步骤b)中测量的结合时,识别出调节CLEC-1与TRIM21之间结合的化合物,特别是识别出增强或降低CLEC-1与TRIM21之间相互作用的化合物。

[0103] 本发明的拮抗剂,特别是与TRIM21结合(特别是特异性地与TRIM21结合)并拮抗CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂,可通过以下方法识别,该方法至少包括以下步骤:

- a) 提供多个表达TRIM21或其片段的细胞,该片段包含TRIM21的至少一个结构域,该结构域选自RING、B盒、卷曲螺旋、PRY和SPRY;

- b) 用候选化合物孵育该细胞(特别是该细胞的裂解物),在包含CLEC-1的至少部分胞外结构域的多肽存在和/或不存在时,测试该候选化合物拮抗CLEC-1与TRIM21之间结合的能力;

- c) 确定该候选化合物是否结合并阻断、抑制或降低CLEC-1与TRIM21之间的结合;
- 以及

- d) 选择结合并阻断、抑制或降低CLEC-1与TRIM21之间结合的候选化合物。

[0104] 用于评估治疗有效的可能性的方法

[0105] 在另一方面,本发明涉及评估抗癌剂和/或CLEC-1/TRIM21信号通路拮抗剂的治疗

有效的可能性的方法,特别是在被诊断患有癌症(特别是具有TRIM21阳性肿瘤或TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症)的患者中,癌症例如乳腺癌、肝细胞癌、淋巴瘤(特别是B细胞淋巴瘤)、结肠癌、甲状腺癌、肝癌、肾癌、黑色素瘤、结直肠癌、鼻咽癌、胰腺癌、慢性感染、败血症、感染(特别是柯萨奇病毒或脑炎病毒感染,更特别是柯萨奇病毒B3或日本脑炎病毒感染)、心血管疾病、自身免疫性疾病(特别是干燥综合征、系统性红斑狼疮或系统性硬化症)、炎性疾病,特别是癌症,该方法包括:

- 确定生物样本中TRIM21的表达,特别是包含肿瘤细胞的生物样本中TRIM21的表达,其中,样本先前获自人类患者;

- 当样本对TRIM21的表达呈阳性时,得出患者可能会从本发明的抗癌剂和/或拮抗性化合物(特别是抗TRIM21拮抗性抗体或其抗原结合片段)的治疗中获益的结论。

[0106] 本发明还涉及评估抗癌剂和/或CLEC-1/TRIM21信号通路拮抗性化合物(例如上述抗体或其抗原结合片段或抗原结合抗体模拟物、CLEC-1或TRIM21的功能性等效物,降低TRIM21表达的化合物)的治疗有效的可能性的方法,当样本对人TRIM21的表达呈阳性时,施用治疗量的抗癌剂和/或抗人TRIM21或抗CLEC-1,例如其抗体和/或其抗原结合片段。

[0107] 本发明还涉及体外或离体方法,用于确定用抗TRIM21(特别是抗人TRIM21化合物)、抗CLEC-1(特别是抗人CLEC-1化合物)、TRIM21(特别是人TRIM21)的功能性等效物或CLEC-1(特别是人CLEC-1)的功能性等效物治疗患有疾病的患者是否可能有效,该方法包括检测先前获自患者的生物样本中TRIM21的表达,当在先前获自患者的生物样本中的细胞(特别是肿瘤细胞)表面和/或细胞(特别是肿瘤细胞)胞液内检测到TRIM21时,治疗可能具有有效性。

[0108] 在一方面,本发明涉及体外或离体方法,用于确定用抗TRIM21(特别是抗人TRIM21化合物)、抗CLEC-1(特别是抗人CLEC-1化合物)或TRIM21(特别是人TRIM21)的功能性等效物或CLEC-1(特别是人CLEC-1)的功能性等效物治疗患有疾病的患者是否可能有效,其中,疾病是癌症,特别是具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症,例如乳腺癌、肝细胞癌、淋巴瘤(特别是B细胞淋巴瘤)、结肠癌、甲状腺癌、肝癌、肾癌、黑色素瘤、结直肠癌、鼻咽癌、胰腺癌,或者疾病是慢性感染、败血症、感染(特别是柯萨奇病毒或脑炎病毒感染,更特别是柯萨奇病毒B3或日本脑炎病毒感染)、心血管疾病、自身免疫性疾病(特别是干燥综合征、系统性红斑狼疮或系统性硬化症)、炎性疾病,并且其中,确定使用上述本发明的拮抗性化合物治疗患者的该疾病是否可能有效的方法包括检测先前获自患者的生物样本中TRIM21的表达,当在先前获自患者的生物样本中的细胞(特别是肿瘤细胞)表面和/或细胞(特别是肿瘤细胞)胞液内检测到TRIM21时,治疗可能具有有效性。

[0109] 在进一步方面,本发明涉及方法,该方法用于治疗人类患者,该人类患者被诊断患有癌症(特别是具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症),例如乳腺癌、肝细胞癌、淋巴瘤(特别是B细胞淋巴瘤)、结肠癌、甲状腺癌、肝癌、肾癌、黑色素瘤、结直肠癌、鼻咽癌、胰腺癌的、慢性感染、败血症、感染(特别是柯萨奇病毒或脑炎病毒感染,更特别是柯萨奇病毒B3或日本脑炎病毒感染)、心血管疾病、自身免疫性疾病(特别是干燥综合征、系统性红斑狼疮或系统性硬化症)、炎性疾病,特别是癌症,其中,该方法包括以下步骤:

- 确定生物样本中TRIM21的表达,特别是包含肿瘤细胞的生物样本中TRIM21的表达,其中,该样本先前获自人类患者;以及

-当TRIM21表达呈阳性时,向人类患者施用制剂,特别是抗癌剂和/或抗人TRIM21拮抗剂,例如但不限于抗体或其抗原结合片段。

[0110] 在进一步方面,本发明涉及增强髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)吞噬能力的方法,特别是增强髓样细胞对TRIM21阳性细胞(特别是肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞,特别是TRIM21阳性肿瘤细胞和/或TRIM21阳性继发性坏死细胞)的吞噬能力的方法,该方法包括:

-选择患有与TRIM21阳性细胞相关的病症(特别是与TRIM21阳性肿瘤细胞和/或TRIM21阳性继发性坏死细胞相关的病症)的患者;以及

-向患者施用有效量的本发明化合物,该化合物抑制CLEC-1/TRIM21信号通路。

[0111] 在进一步方面,本发明涉及增强髓样细胞(特别是树突状细胞和/或巨噬细胞)吞噬能力的方法,特别是增强髓样细胞对TRIM21阳性细胞(特别是肿瘤细胞和/或继发性坏死细胞,特别是TRIM21阳性肿瘤细胞和/或TRIM21阳性继发性坏死细胞)的吞噬能力的方法,该方法包括向有需要的患者施用有效量的抑制CLEC-1/TRIM21信号通路的本发明化合物。

[0112] 在进一步方面,本发明涉及化合物在制造用于治疗患有疾病的患者的药物中的用途,该化合物抑制C型凝集素样受体-1(CLEC-1)/含三结构域基序蛋白21(TRIM21)信号通路,特别是拮抗CLEC-1与TRIM21之间的结合,更特别是人CLEC-1与人TRIM21之间的结合,其中,该化合物与TRIM21结合(特别是特异性地与TRIM21结合),与参与CLEC-1/TRIM21信号通路的胞内分子结合,或降低功能性TRIM21的表达或者是TRIM21的功能性等效物,特别是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗性化合物,其与TRIM21结合(特别是与人TRIM21结合,特别是特异性地与TRIM21结合),特别地,疾病选自癌症(特别是具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症),例如乳腺癌、肝细胞癌、淋巴瘤(特别是B细胞淋巴瘤)、结肠癌、甲状腺癌、肝癌、肾癌、黑色素瘤、结直肠癌、鼻咽癌、胰腺癌、慢性感染、败血症、感染(特别是柯萨奇病毒或脑炎病毒感染,更特别是柯萨奇病毒B3或日本脑炎病毒感染)、心血管疾病、自身免疫性疾病(特别是干燥综合征、系统性红斑狼疮或系统性硬化症)和炎性疾病。

[0113] 特别地,该方法用于治疗被诊断患有癌症(特别是具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症)的人类患者,例如乳腺癌、肝细胞癌、淋巴瘤(特别是B细胞淋巴瘤)、结肠癌、甲状腺癌、肝癌、肾癌、黑色素瘤、结直肠癌、鼻咽癌、胰腺癌、慢性感染、败血症、感染(特别是柯萨奇病毒或脑炎病毒感染,更特别是柯萨奇病毒B3或日本脑炎病毒感染)、心血管疾病、自身免疫性疾病(特别是干燥综合征、系统性红斑狼疮或系统性硬化症),特别是癌症。该方法可包括在施用制剂(特别是抗癌剂)之前、在使用制剂(特别是抗癌剂)治疗期间或使用第一或另一种制剂(特别是抗癌剂)治疗之后,确定先前获自患者的生物样本(特别是包含病变细胞(特别是肿瘤细胞)的生物样本)是否包含表达TRIM21的细胞的步骤。当该样本可被认为呈TRIM21阳性时,特别是当患者患有TRIM21阳性肿瘤细胞时,可以进行治疗。

[0114] 可使用如本文所述的包含CLEC-1的胞外结构域的嵌合分子(特别是使用本文所述的Fc-CLEC-1)来确定人TRIM21的表达。

[0115] 本发明的化合物可作为治疗剂(特别是抗癌剂)施用,也可作为另一种活性剂加入到用另一种制剂(特别是抗癌剂)的治疗中,特别是施用于具有CLEC-1阳性肿瘤细胞和/或TRIM21阳性肿瘤细胞的患者。

[0116] 因此,本发明提供了先前提取自患者的生物样本(例如包含肿瘤细胞、凋亡细胞或

坏死细胞的样本)的细胞中表达的TRIM21,其用作选择接受免疫治疗抗癌剂或化疗抗癌剂治疗的患者的阳性标记物的用途。可选地,该用途包括标记物的定量。

[0117] 在进一步方面,本发明涉及用于治疗被诊断患有癌症的人类患者的方法,该人类患者患有TRIM21阳性肿瘤。TRIM21阳性肿瘤可对应于其中至少一个细胞表达TRIM21的肿瘤。因此,本发明还涉及方法,其中,在(先前)获自患者的生物样本中测量肿瘤细胞中TRIM21的存在或TRIM21的异常表达,当肿瘤细胞表达TRIM21或表现出TRIM-21的异常表达时,向患者施用本文详细描述抑制CLEC-1/TRIM21信号通路的化合物。可以通过比较获自相同患者的健康细胞或获自另一患者的健康细胞中的TRIM-21表达来评估TRIM-21的异常表达。

[0118] 本发明还涉及TRIM21(特别是人TRIM21)在体外测试中作为生物标记物用于评估用与CLEC-1或TRIM21结合的化合物(该化合物是CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂)治疗患有疾病(特别是癌症,更特别是具有TRIM21阳性肿瘤细胞的癌症)的患者是否可能有效的用途。

[0119] 本发明的进一步方面和特征将在以下实施例和附图中找到。

[0120] 以下附图和实施例是为了向本领域的普通技术人员提供关于如何制造和使用本发明的完整公开和描述,而不是为了限制发明人所认为的本发明的范围,也不是为了表示以下的实验是全部或唯一进行的实验。虽然本发明已参照其具体实施方式进行了描述,但本领域的技术人员应理解,在不背离本发明的真正实质和范围的情况下,可以进行各种修改,也可以用等效物替代。此外,还可以做出许多修改,以使特定情况、材料、物质的组成、过程、过程步骤或步骤适应本发明的目标、实质和范围。所有这些修改都旨在本发明所附的权利要求书的范围之内。

附图说明

[0121] 图1:用RAJI细胞系裂解物的内容物进行Fc-CLEC-1的免疫沉淀的SDS-PAGE分析。
A:免疫沉淀洗脱产物在无染色的4-15%凝胶上进行SDS-PAGE分离。仅包被Fc的蛋白G磁性微珠(泳道1和2);无Fc蛋白(泳道3);Fc-CLEC-1蛋白(泳道4和5)。将RAJI WCE(全细胞提取物)蛋白(泳道5)的Fc-CLEC-1A免疫沉淀与几个对照组进行比较:仅Fc(泳道1)、Fc+RAJI WCE(泳道2)、仅RAJI WCE(泳道3)和仅Fc-CLEC-1A(泳道4)。灰色和白色三角形表示仅在Fc-CLEC-1A+RAJI WCE条件下(泳道5)存在的离散条带。星号表示单体*(即部分变性)和二聚**Fc融合重组蛋白。B:通过SDS-PAGE在胶体考马斯(coomassie)染色的4-15%凝胶上分离免疫沉淀洗脱产物。如A中所述地进行免疫沉淀。正方形表示从凝胶中切下用于质谱分析的区域,其对应于对Fc-CLEC-1-RAJI WCE共免疫沉淀特异性的主要条带(泳道7和8中的正方形对应于A中的白色三角形,并且来自与泳道5相同的提取物)。泳道6、9和10中的正方形对应于明显相同尺寸水平的对照组(泳道6:仅Fc-CLEC;泳道9和10:仅RAJI WCE)。

[0122] 图2:CLEC-1A的候选配体分析。从图1所示的SDS-PAGE提取的50kDa条带的内容物以及在细胞蛋白提取物与结合Fc-CLEC-1的微珠的相互作用之后得到的总洗脱物的分子分析。RAJI对应于来自RAJI细胞的提取物。HPB-ALL对应于来自白血病细胞系HPB-ALL(DSMZ No. ACC 483)的提取物。

[0123] 图3:TRIM21与CLEC-1A的共免疫沉淀。用含有仅Fc(泳道2、6和10)、Fc-CLEC-1A(泳

道3、7和11)、Fc-dectine-1A(泳道4、8和12)或无Fc融合蛋白(泳道1、5和9)的磁珠对来自RAJI细胞(泳道5至8)或MoDC(泳道9至12)的WCE蛋白进行免疫沉淀。泳道1至4是无细胞提取物的对照组。A:用抗TRIM21抗体对共免疫沉淀(IP)蛋白进行蛋白质印迹(Western Blot)检测。在含有Fc-CLEC-1A的样本中显示TRIM21(条带为52kDa)。B:未保留的提取物(从IP上清液去除的样本)的蛋白质印迹。Fc-CLEC-1a也被去除(泳道7和11)。C:在50倍摩尔过量的不同抗体存在下,用固定化Fc-CLEC进行RAJI(上)或MoDC(下)全细胞提取物的共免疫沉淀:A.阴性对照抗体,B.抗TRIM21抗体(PA5-22294,Invitrogen)。通过蛋白质印迹显示结合的TRIM21。

[0124] 图4:人Fc-CLEC1和His-CLEC在TRIM21上的ELISA结合。

[0125] 将重组人TRIM21蛋白固定在板上。在板饱和之后,通过TRIM21捕获生物素化Fc-CLEC1-A蛋白的剂量反应。Fc-CLEC1-生物素和His-CLEC1-生物素对应于本文所述的CLEC1蛋白,它们具有His标记或Fc部分,并且是生物素化的。Hum Fc对照组OSE对应于自制的人类Fc受体结构域。

[0126] 图5:抗TRIM21抗体对CLEC-1和TRIM21之间结合的拮抗活性的ELISA测定。(A)抗TRIM21抗体靶向的表位在全长TRIM21蛋白中的定位。方框表示TRIM21的不同结构域,箭头表示与每个箭头相关的抗体所识别的区域。数字对应于全长TRIM21蛋白中的氨基酸残基定位。(B)实验中使用的抗TRIM21抗体列在图的右侧。将重组人TRIM21蛋白固定在板上。用抗TRIM21抗体使板饱和,进行生物素化Fc-CLEC1蛋白的剂量反应。

[0127] 图6:在不同抗CLEC1抗体(α CLEC-1单抗#3和 α CLEC-1单抗#5)、抗TRIM21抗体(Fisher PA5-22295)和与CLEC-1或TRIM21结合的对照抗体存在时TRIM21与CLEC-1之间的相互作用。(A)表示与对应于对照抗体存在时的实验的基线相比,TRIM21和CLEC1之间相互作用的百分比。(B)是SDS-PAGE,显示了在上述抗体的存在下,TRIM21与Fc-CLEC或Fc-对照的共免疫沉淀。(C)BIACORE。

[0128] 图7:与未经处理的HPC-ALL细胞相比,在浓度增加的FC-CLEC-1A或Fc-对照肽的存在下,人巨噬细胞对HPB-ALL细胞的吞噬指数。

[0129] 图8:在利妥昔单抗(10ng/ml)和不同抗TRIM21抗体、抗CLEC1抗体或对照抗体存在下,对TRIM-21阳性肿瘤细胞(Raji细胞)的吞噬作用。(A)、(B)和(C):抗TRIM21抗体对应于本说明书中称为MAB-62191(图8A)MAB-6219(1)(图8B)的抗TRIM21抗体,其与位于SEQ ID No.2的TRIM21的氨基酸残基195和293之间的氨基酸序列结合或与对应于SEQ ID No.8所示的氨基酸序列的免疫原结合。抗CLEC1抗体对应于本说明书中称为 α CLEC-1单抗#5的抗CLEC1抗体,其具有SEQ ID No.10的重链和SEQ ID No.的轻链(图8C)。(D):Raji细胞裂解物上的抗TRIM21的蛋白质印迹。将Raji细胞裂解物(50 μ g样本)和对照重组TRIM21蛋白(0,010 μ g)迁移到10%SDS-Page无染色凝胶(Biorad)上,转移到硝酸纤维素膜上,与抗TRIM21抗体(克隆AB01/1G5(Biorad,#VMA00730))一起孵育,然后用过氧化物酶标记的抗小鼠抗体(Jackson Immunoresearch#715-036-151)显示。在Raji裂解物和对照蛋白上检测到50KDa的TRIM21蛋白。

[0130] 图9:拮抗性单克隆抗体抑制CLEC-1与TRIM21的相互作用对巨噬细胞介导的吞噬作用具有正面作用。A:在缺乏CLEC-1表达(但表达TRIM21)的肿瘤细胞系中,用 α CLEC-1单抗#5处理来抑制CLEC-1与TRIM21的相互作用不会增强巨噬细胞介导的吞噬活性。B:在同时

表达CLEC-1和TRIM21的肿瘤细胞系中,用 α CLEC-1单抗#5处理来抑制CLEC-1与TRIM21的相互作用增强了巨噬细胞介导的吞噬活性。

具体实施方式

[0131] 材料和方法

[0132] 重组可溶性人Fc-CLEC1蛋白的制备

[0133] 可溶性Clec1人IgG Fc嵌合体 (Fc-Clec-1) 是通过将人Clec-1的胞外结构域(Q74-D280) 克隆至pcDNA3.1中产生的,该结构域在N端与人IgG1e3 Fc序列融合。IgG1e3Fc序列含有以下突变:E233P/L234V/L235A/ Δ G236+A327G/A330S/P331S(替换为IgG2和IgG4残基,以降低Fc γ RI结合和ADCC/CDC)。详细的序列在技术数据表pFuse-hIgG1e3-Fc1 (Invivogen# pfc1-hg1e3) 中可找到。Fc-Clec序列的合成是在Genscript订购的,限制位点XhoI在5'处, XbaI在3'处,用于克隆至pcDNA3.1。为了在哺乳动物细胞中表达,在序列的开头加入Kozak序列(GCCACC-SEQ ID No.10)和IgK前导信号肽(METDTLLLWVLLLWVPGSTGD-SEQ ID No.9)。用Nucleobond Xtra Midi EF试剂盒(Macherey Nagel#740420.50)对质粒pcDNA3.1-Fc-Clec进行中量提取(Midiprep)。通过使用293Fectine转染试剂(Thermofisher#12347019)瞬时转染,在Hek free style细胞(Thermofisher#R79007)中制备重组Fc-Clec蛋白。在60ml free style 293培养基(Thermofisher#12338018)中用60 μ g质粒pcDNA3.1-Fc-Clec和120 μ l 293Fectine来转染60.106Hek free style细胞。制备持续5天,然后用3000G离心30分钟来澄清上清液,并用0.22 μ M Stericup(Merck Millipore#SCGPU05RE)进行过滤。在HiTrap蛋白A柱(GE#17040201)上纯化澄清的上清液,用pH 3的0.1M柠檬酸洗脱。在Microsep Advance10kDa(Pall#MCP010C41)上浓缩洗脱液,然后在0.22 μ M过滤器上过滤。

[0134] 诱导单核细胞衍生的树突状细胞(MoDC)

[0135] 通过用经典单核细胞试剂盒Miltenyi (130-117-337)或CD14微珠(130-050-201)进行磁性PBMC分选后得到的单核细胞来生成MoDC。在完全RPMI培养基(10% FCS;1% PS;1% L-谷氨酰胺;1x丙酮酸钠;1x NEAA;1mM HEPES)中培养单核细胞6-7天,并加入50ng/mL GM-CSF(Miltenyi-130-095-372)和20ng/ml IL-4(Miltenyi-130-093-917)。通过在20ng/ml TGFb的存在下培养2天,未成熟树突状细胞(iDC)进一步变为完全分化的MoDC。

[0136] 从细胞制备全细胞蛋白提取物(WCE)

[0137] 用冷PBS彻底洗涤淋巴母细胞系RAJI和MoDC细胞。然后将细胞沉淀重悬于5倍体积的冰冷温和RIPA-IP裂解缓冲液中,该缓冲液由PBS(Corning)、1% NP-40、0.25%脱氧胆酸钠和1x蛋白酶抑制剂混合物(PIC)(均来自Sigma Aldrich)组成。为完成细胞裂解,将样品置于-150°C快速冷冻,然后在冰水中解冻。重复两次该循环。通过14000g离心15分钟(4°C),使细胞裂解液澄清。用BCA测定法来评估蛋白质浓度。

[0138] Fc融合蛋白免疫沉淀和候选条带分离

[0139] 根据生产商的建议制备蛋白G Surebeads磁性微珠(Biorad),并在PBS+0.1% Tween-20(Sigma Aldrich)中重悬。将30pmol Fc融合蛋白(仅Fc、Fc-CLEC-1或Fc-hDectin-1A(Invivogen))加入至30 μ l磁性微珠每IP的初始体积中。使Fc融合蛋白在+4°C的转盘上与微珠结合1小时。在PBS-吐温(tween)中洗涤3次之后,在PBS中洗涤1次,然后加入1mg WCE提取物,最终体积为600 μ l冷PBS+1x PIC中。在转盘上在+4°C下进行2-3小时的相互作用。收集

上清液,在转盘上在600u1中洗涤磁性微珠5分钟,然后进行2分钟的磁性捕获,所有过程均在+4°C下进行:一次在PBS中,两次在含有500mM NaCl的PBS中,两次在PBS中。在室温下孵育10分钟后,将结合的蛋白质回收到15u1洗脱缓冲液中,该缓冲液由含有250mM DTT(Sigma)的1x Laemmli缓冲液(BioRad)组成。收集洗脱液并在SDS-PAGE上分离蛋白质。用胶体考马斯(0.08%考马斯亮蓝G250、10%柠檬酸、8%硫酸铵(均来自Sigma)、20%甲醇(Fisher))染色SDS-聚丙烯酰胺凝胶,在缓慢摇动下染色6小时至过夜。用蒸馏水脱色凝胶,直至背景清晰。切割出感兴趣的条带,并通过质谱分析进行研究。

[0140] 凝胶内消化、提取和质谱分析

在挤出条带之后,用50μL 25mM碳酸氢铵(NH_4HCO_3)和50μL乙腈洗涤凝胶塞四次。在57°C下用50μL 10mM二硫苏糖醇还原半胱氨酸残基,并用50μL 55mM碘乙酰胺进行烷基化。用乙腈进行脱水之后,用200ng改性猪胰蛋白酶(Promega)在25mM NH_4HCO_3 溶液中裂解凝胶中的蛋白质。在37°C下进行消化过程过夜。用0.1%甲酸中60%乙腈提取产生的肽,然后用100%乙腈进行第二次提取。在真空下蒸发乙腈,然后将肽重悬于25μL H₂O和0.1%的甲酸中,然后进行质谱分析。使用nanoACQUITY Ultra-Performance_LC系统(Waters,Milford,MA)对胰蛋白酶肽进行纳米液相色谱-质谱/质谱(NanoLC-MS/MS)分析,该系统与配备有纳米电喷雾离子源的TripleTOF 5600质谱仪(ABSciex公司)联用。

[0141] 样品在Symmetry C18预柱(20 × 0.18mm,5μm,Waters Corp.)上捕集,在ACQUITY UPLC®BEH130 C18色谱柱(75μm × 250mm,1.7μm particle size,Waters Corp)上分离肽。溶剂系统由0.1%甲酸水溶液(溶剂A)和0.1%甲酸乙腈溶液(溶剂B)组成。进行捕集3分钟,流速为5μL/min,溶剂A含量为99%,溶剂B含量为1%。使用3%-25%(溶剂B)的梯度进行洗脱流速为300nL/min的洗脱60分钟,然后在60°C下使用25%-40%的梯度进行20分钟,最后使用80%(溶剂B)的梯度进行10分钟。

[0142] 质谱仪以阳性模式运行,设置如下:离子喷雾电压浮动(ISVF)2300V,帘气(CUR)25psi,界面加热器温度(IHT)75°C,离子源气体1(GS1)2psi,解聚电位(DP)100V。使用信息依赖采集(IDA)模式进行前5次MS/MS扫描。在高灵敏度模式下,MS扫描在m/z[400-1250]范围内的累积时间为50ms,MS/MS扫描50ms的m/z[150-1600]范围。设定切换标准为电荷状态为2-4且丰度阈值高于150计数的离子,设定排除时间为12s。IDA滚动碰撞能量脚本用于自动调整CE。分析仪的质量校准是通过使用来自消化BSA的肽来实现的。整个系统由AnalystTF 1.6(AB Sciex)完全控制。

[0143] 处理采集的原始数据,并转换为“.mgf峰列表”格式。

[0144] 数据分析和蛋白质识别

[0145] 使用了搜索引擎MASCOT 2.6.2算法(Matrix Science)。该搜索针对人类数据库和相同的反向序列(“靶/诱饵”数据库)进行。选择胰蛋白酶为裂解酶,允许最多一次漏切、一个可变修饰(蛋氨酸残基的氧化)和一次固定修饰(半胱氨酸的氨甲基化)。

[0146] 用MS的20ppm的质量公差和0.07Da的MS/MS数据搜索光谱。

[0147] 将 Mascot 结果载入 Proline 软件进行验证(<http://proline.profiptroteomics.fr>)。用于验证,应用的蛋白质集(蛋白质水平)的错误发现率(FDR)为1%。

[0148] 蛋白质印迹

[0149] 将通过SDS-PAGE分离的蛋白质转移至硝酸纤维素膜上之后,在PBS-吐温+5%BSA (Sigma)中完成阻断。在4℃下用抗TRIM-21 (SCBT sc-25351 1/1000e)对膜进行进行过夜 (O/N)连续孵育,用Clarity ECL底物 (Biorad)显示抗小鼠-HRP缀合物 (Jackson)。

[0150] ELISA

[0151] 通过ELISA进行Fc-CLEC-1A与TRIM21相互作用的测量。在4℃下,用碳酸盐缓冲液 (pH 9.2)中的2μg/ml TRIM21-his (Sino 18010-H07B),在Polysorp 96孔板 (Nunc)的每个孔中涂覆50μl。用超级阻断缓冲液 (#37515, Thermofisher)使板饱和。在37℃下,以50μl PBS-吐温0.05%-BSA 1%中30μg/ml的浓度捕获Fc和Fc-CLEC-1A生物素耦合蛋白2小时。在强力洗涤之后,在37℃下1小时,用PBS-Tween 0.05%、50μl/孔中的1/1000稀释的链霉亲和素 (Streptavidin)-P0 (JI 016-030-084)检测结合的蛋白1小时,TMB (Sigma T8665)用于显示。

[0152] 通过ELISA测量商用抗TRIM21抗体对CLEC1/TRIM21结合相互作用的拮抗作用。在4℃下,将重组人TRIM21蛋白 (#18010-H07B, Sinobiological)以碳酸盐缓冲液 (pH 9.2)中2μg/ml的浓度固定在96孔Polysorp板上过夜。用超级阻断缓冲液 (#37515, Thermofisher)使板饱和,然后加入过量 (20μg/ml)的商用抗TRIM21抗体。根据剂量反应,以30μg/ml加入生物素化人Fc-CLEC1 (#07/08/20, OSE IMMUNO)或His-CLEC1 (#1704-CL, Biotechne)蛋白,以测量结合。在孵育和洗涤之后,加入链霉亲和素-过氧化物酶 (#016-030-084, Jackson Immunoresearch, 美国),并用常规方法显示。

[0153] BIAcore上的CLEC/TRIM21相互作用

[0154] 通过PP2I平台 (Cytiva, 法国)在T200 (Cytiva, 法国)上进行分析。将重组人TRIM21蛋白 (由Baculovirus制备, Sinobio#18010-H07B)固定在浓度为20μg/ml乙酸盐10mM pH5缓冲液中的CM5传感芯片 (Cytiva)上。将His-CLEC (在NS0细胞系中制备, Biotechne#1704-CL)以1μM的浓度单独,或在与5μM的拮抗性抗CLEC单抗共同孵育之后注射到固定化TRIM-21重组蛋白上。

[0155] 通过共免疫沉淀 (co-IP) 进行拮抗测定法

[0156] 与上述Fc融合蛋白免疫沉淀方法相似,调整了数量并做出以下改变,进行了co-IP:在每个反应中使用了用于拮抗活性测试的5pmol Fc融合蛋白、150ug WCE和250pmol抗体。在将提取物载入含有Fc-CLEC融合蛋白的微珠之前,在+4℃下,将抗体与其靶 (WCE)孵育30分钟用于抗TRIM抗体;微珠与Fc-CLEC融合蛋白结合用于抗CLEC抗体。通过SDS-PAGE分离洗脱的蛋白质,并通过蛋白质印迹显示。通过Chemidoc Imaging系统 (BioRad)进行定量。

[0157] 吞噬作用测定法

[0158] 通过将 2.5×10^4 个用CellTrackerGreen (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, 美国, 1/2000, 20min, 37℃)标记的人M1巨噬细胞和 5×10^4 个用CPD (ThermoFisher, 1/2000, 10min, 37℃)标记的白血病HPB-ALL细胞或Raji细胞在无血清的RPMI中共培养1小时来进行体外吞噬测定法。用CytoFLEX流式细胞仪 (Beckman, Brea, California, 美国)分析吞噬作用,并用FlowJo软件 (TreeStar, BD Life Sciences Franklin Lakes, New Jersey, 美国)进行分析。吞噬指数的计算方法如下:与对照组孔 (未处理)中检测到的CTG+巨噬细胞中CPD+细胞相比的百分比的倍数变化,乘以与对照组孔 (未处理)中检测到的CTG+巨噬细胞中APC荧光 (CPD)相比的倍数变化的几何平均。应用的处理

是如图9所示浓度的Fc对照组 (IgG1-E3) 或FcCLEC1A (IgG1-E3), 或参照为MAB-6219 (1) 和MAB-62191的抗TRIM21抗体, 或参照为 α CLEC-1单抗#5的抗CLEC1抗体, 浓度为10 μ g/ml (图8)。参照为 α CLEC-1单抗#5的抗CLEC-1抗体具有SEQ ID No.10的重链可变结构域和SEQ ID No.11的轻链可变结构域。

[0159] 主要的人巨噬细胞介导的对TRIM21+/CLEC1+相对于TRIM21+/CLEC1-肿瘤细胞的吞噬作用。在无血清RPMI中通过将 2.5×10^4 个用CellTrackerGreen (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, 美国, 1/2000, 20min, 37°C) 标记的人M1巨噬细胞和 5×10^4 个用CPD (ThermoFisher, 1/2000, 10min, 37°C) 标记的肿瘤细胞共孵育15min来进行体外吞噬作用测定法。这些测定法中使用的肿瘤细胞是表达TRIM21但不表达CLEC-1的THP1细胞, 或同时表达TRIM21和CLEC-1的THP1细胞 (通过慢病毒转导人全长序列的CLEC-1基因来表达CLEC-1)。通过CytoFLEX流式细胞仪 (Beckman, Brea, California, 美国) 分析吞噬作用, 并使用FlowJo软件 (TreeStar, BD Life Sciences Franklin Lakes, New Jersey, 美国) 进行分析。吞噬指数的计算方法如下: 与用同种型对照组处理检测到的CTG+巨噬细胞中CPD+细胞相比的百分比的倍数变化, 乘以与用同种型对照组处理检测到的CTG+巨噬细胞中APC荧光 (CPD) 相比的倍数变化的几何平均。在图9的测定法中使用的拮抗性单克隆抗体是 α CLEC-1单抗#5和对应的同种型对照组 (Evitria, Schlieren, 瑞士)。

[0160] 实施例1: TRIM21识别为CLEC-1的配体

[0161] 之前已有尝试从文库中或从在强力离子洗涤剂条件下得到的内源性细胞蛋白中捕获CLEC-1A配体, 但均未成功。研究表明, CLEC-1A配体大量存在于RAJI细胞系的透化细胞中。由于这些细胞在细胞培养物中很容易扩增, 可以制备大量的具有可用的配体的细胞蛋白提取物。由于之前使用强力洗涤剂的尝试无法捕捉到丰富的胞内配体, 因此, 从细胞中提取的配体的质量和完整性是一个值得关注的问题。为了得到这种完整性, 申请人搜索了特定的合适条件, 重点关注较温和的洗涤剂提取和相互作用条件。

[0162] 在阴离子洗涤剂含量较低RIPA-IP缓冲液中裂解RAJI细胞, 并通过反复冷冻-解冻循环机械破坏细胞的区室。为了从得到的全细胞提取物 (WCE) 中识别CLEC-1的配体, 使用了由二聚体形式的人CLEC1A的胞外结构域与人IgG的Fc部分融合而成的融合蛋白。CLEC7a (Dectin-1) 融合蛋白和二聚Fc片段用作对照。首先, 将Fc、Fc-CLEC1A或无捕获蛋白通过其Fc片段直接与蛋白G磁性Surebeads结合。RAJI WCE与磁性微珠结合蛋白相互作用, 在低洗涤剂但高盐的条件下仔细地洗涤, 并在不加热的情况下用250mM DTT洗脱。对洗脱的蛋白质进行SDS-PAGE分离, 发现在对照条件下 (图1A, 泳道1-4) 具有清晰的背景, 只有少数Fc-CLEC-1A特异性条带 (图1A, 泳道5)。低背景证实了我们的假设, 即需要温和的相互作用条件在不使其变性的情况下捕获配体。重复一式两份实验, 切割出50kDa左右的Fc-CLEC1A主要特异性条带, 用于质谱分析 (图1B)。

[0163] 在该条带上, 或在RAJI或HPB-ALL WCE与结合Fc-CLEC相对于仅Fc的微珠相互作用之后得到的总洗脱液上进行质谱分析。对原始数据进行了过滤, 以消除常规的杂质 (例如皮肤蛋白) 和与Fc结合的蛋白。最终的候选名单包含识别出至少7种特异性肽的蛋白质 (图2)。TRIM21 E3泛素-蛋白连接酶在该候选名单中表现突出, 它是唯一一种在RAJI细胞的三重条件和HPB-ALL细胞的一重条件下序列覆盖率超过50%的蛋白质。其他的候选物的得分较低, 主要是细胞骨架蛋白和丰富的细胞蛋白。

[0164] 实施例2:TRIM21与CLEC-1之间的相互作用

[0165] 由于TRIM21是已知的胞内Fc受体,需要验证其与Fc-CLEC-1A的结合是通过CLEC-1A本身而不是其Fc部分介导的。因此,以Fc和Fc-Dectin为对照组,重复了免疫沉淀,并通过抗TRIM21蛋白质印迹显示了结合的蛋白质。用RAJI细胞提取物证实了来自RAJI WCE的TRIM21与Fc-CLEC-1A具有强力的共免疫沉淀(co-IP)作用(图3A,泳道7),而Fc-Dectin则检测不到信号(泳道8),仅Fc的信号更低(泳道6)。这种微弱的信号主要是由于在没有细胞提取物的存在时仅由Fc产生的背景信号,可能是由于HRP偶联的抗小鼠Fc二级抗体对Fc的交叉反应检测。只有通过含有Fc-CLEC-1A的磁性微珠才能去除IP反应之后的含有未保留的蛋白质上清液中(图3B)的TRIM21,而仅Fc、Fc-Dectin或无Fc融合蛋白的磁性微珠则不能去除TRIM21(将泳道7与泳道5、6和8比较),这一事实进一步证实了Fc-CLEC-1A与TRIM21之间的特异性相互作用。使用单核细胞衍生树突状细胞(MoDC)蛋白提取物作为起始内源性蛋白混合物来重复该实验。观察到了相同的TRIM21的特异性coIP(图3A泳道11),甚至具有更强的相互作用信号以及CLEC-1A对蛋白提取物中TRIM21的消耗也非常明显(图3B泳道11)。总之,这些实验证明了Fc-CLEC-1A与内源性TRIM21之间强力且特异性的相互作用,该相互作用不是通过融合蛋白的Fc部分,而是通过CLEC-1A本身介导的。我们先前观察到CLEC-1A与渗透性RAJI细胞和MoDC结合,这一事实证明了该相互作用的真实性。图3C显示,与阴性对照抗体(泳道3)相比,抗TRIM21抗体防止了TRIM21与固定化CLEC-1的结合(泳道4),从而显示了抗TRIM21抗体对CLEC-1/TRIM21相互作用的拮抗作用。

[0166] 共免疫沉淀显示了CLEC-1A与细胞蛋白混合物中的内源性TRIM21之间存在相互作用。然而,为了证明这种相互作用是直接的,没有任何可能介入细胞提取物的同伴,用重组Fc-CLEC1A、His-CLEC1A和TRIM21蛋白进行了ELISA实验。Fc耦合蛋白或His耦合蛋白与TRIM21结合的ELISA剂量反应曲线显示了从1 μ g/ml的浓度开始的CLEC-1A与TRIM21的选择性结合(图4A),且与任何Fc融合蛋白对照组均没有结合。有趣的是,与仅Fc(Fc-生物素对照组)也没有结合,这表明在这些浓度下,CLEC-1A与TRIM21之间的相互作用不是通过Fc片段介导的。此外,没有观察到TRIM21与其他的C型凝集素受体Dectine-1之间的相互作用(图4B),这支持了特异性和选择性的TRIM21-CLEC-1A的直接相互作用。人His-CLEC1和人Fc-CLEC1与人TRIM21以分别为13和15 μ g/ml的EC₅₀结合。图4B进一步说明了这一点,其中,在10 μ g/ml的固定浓度下(CLEC1A或对照组),Fc-CLEC1A是唯一与涂覆的TRIM21蛋白相互作用的蛋白质。在不存在涂覆TRIM21的情况下,没有观察到任何Fc融合蛋白的非特异性结合。如图4C所示,浓度为10 μ g/ml的Fc-CLEC-1与涂覆TRIM21的表面结合,而不能与未涂覆TRIM21的表面结合。由此可见,TRIM21与CLEC-1相互作用。因此,与TRIM21或CLEC1A结合并可以拮抗这两种分子之间相互作用的化合物是有效的治疗剂,特别是治疗涉及TRIM21和/或CLEC-1,特别是涉及TRIM21/CLEC-1信号通路的疾病。该ELISA相互作用的验证证实了co-IP结果,并验证了来自淋巴瘤细胞或树突状细胞的内源性TRIM21与CLEC-1A的直接相互作用,因此识别出第一内源性CLEC-1A配体。

[0167] 总之,生物素化His-CLEC-1A和Fc-CLEC1A与TRIM21结合。CLEC-1与TRIM21之间的结合与Fc结构域无关,这些实验说明了CLEC-1与TRIM21之间的直接相互作用。为了进一步说明CLEC-1与TRIM21之间的这种直接相互作用,在包被或未包被TRIM21的表面上加入了生物素化Fc-CLEC-1和His-CLEC-1。

[0168] 实施例3:CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗性化合物

[0169] 测试了五种商用抗TRIM21抗体对TRIM21/CLEC1相互作用的拮抗活性。

制造商	参照号	同种型	克隆性	免疫原(氨基酸)
Santacruz	sc-25351	小鼠IgG1	单克隆	141-280
Fisher	PA5-22294	兔IgG	多克隆	254-457
Fisher	PA5-18147	羊IgG	多克隆	TRIM21的C端
Biotechne	MAB6219	小鼠IgG1	单克隆	195-293
Biotechne	MAB62191	小鼠IgG2a	单克隆	195-293

[0170] 抗TRIM21拮抗性抗体sc-25351、PA5-22294、PA5-18147和MAB-62191、MAB-621911特别有希望拮抗CLEC1A与TRIM21之间的相互作用。图5A显示了本实施例中使用的每种抗TRIM21抗体与TRIM21蛋白之间相互作用的结构域。如图5B所示,这些抗体降低了Fc-CLEC1与TRIM21之间的相互作用的作用的高于50%。因此,数种不同的抗TRIM21抗体能特异性地拮抗CLEC-1与TRIM21之间的结合。

[0171] 测试了抗CLEC-1和抗TRIM21拮抗性抗体,以评估在对应的测定法中它们各自对TRIM21/CLEC-1相互作用的效果。在这些实验中,比较了两种内部(in-house)抗CLEC-1抗体(α CLEC-1单抗#3和#5)和抗TRIM21抗体Fisher PA5-22295的拮抗作用;这三种抗体分别降低了40%、55%和65%的CLEC-1与TRIM21之间的结合(图6A)。在Fc-CLEC对细胞内源性TRIM-21的co-IP的拮抗剂测定法中也测得了相同的效果(图6B)。这些结果说明,抗TRIM21抗体可能有助于降低或抑制CLEC-1与TRIM21之间的相互作用。

[0172] 实施例4:在阻断CLEC-1/TRIM21信号通路的化合物存在下髓样细胞对TRIM21阳性细胞的吞噬作用

[0173] 图7显示了在Fc-CLEC1A(干扰CLEC-1A与TRIM21之间结合的化合物)存在时HPB-ALL细胞(T细胞白血病模型)的吞噬作用的结果。本发明人发现,用FcCLEC1A处理T-ALL细胞系HPB-ALL(TRIM-21阳性细胞),从而防止了CLEC1A与其配体TRIM21的相互作用,诱导了人巨噬细胞对HPB-ALL细胞的吞噬活性的增强,然而,用Fc对照组处理肿瘤细胞时则检测不到该现象。

[0174] 图8显示了利妥昔单抗和不同的抗TRIM21抗体(图8A-B)或抗CLEC-1抗体(图8C)对TRIM21阳性肿瘤细胞(Raji细胞)的组合疗法的结果,这些抗体均为抗CLEC-1抗体与TRIM21之间结合的拮抗剂。如图8D所示,Raji细胞是TRIM21阳性肿瘤细胞。当施用这两种抗体时,对TRIM21阳性肿瘤细胞(Raji细胞)的吞噬为总TRIM21阳性肿瘤细胞(Raji细胞)的约40%,而不施用抗TRIM21抗体时的吞噬为25%。因此,当CLEC-1/TRIM21信号通路受到干扰时,TRIM21阳性肿瘤细胞(Raji细胞)的吞噬能力会很大程度地提高。

[0175] 图9说明了抗CLEC-1抗体(CLEC-1与TRIM21结合的拮抗剂)对巨噬细胞介导的吞噬作用的正面作用。在缺乏CLEC-1表达(但表达TRIM21)的肿瘤细胞系中,抗CLEC-1抗体不会增强巨噬细胞介导的吞噬活性。然而,在同时表达CLEC-1和TRIM21的肿瘤细胞系中,抗CLEC-1抗体(CLEC-1与TRIM21之间结合的拮抗剂)增强了巨噬细胞介导的吞噬活性。所有这些数据都为抑制CLEC1A与其配体TRIM 21的相互作用提供了功能性应用。

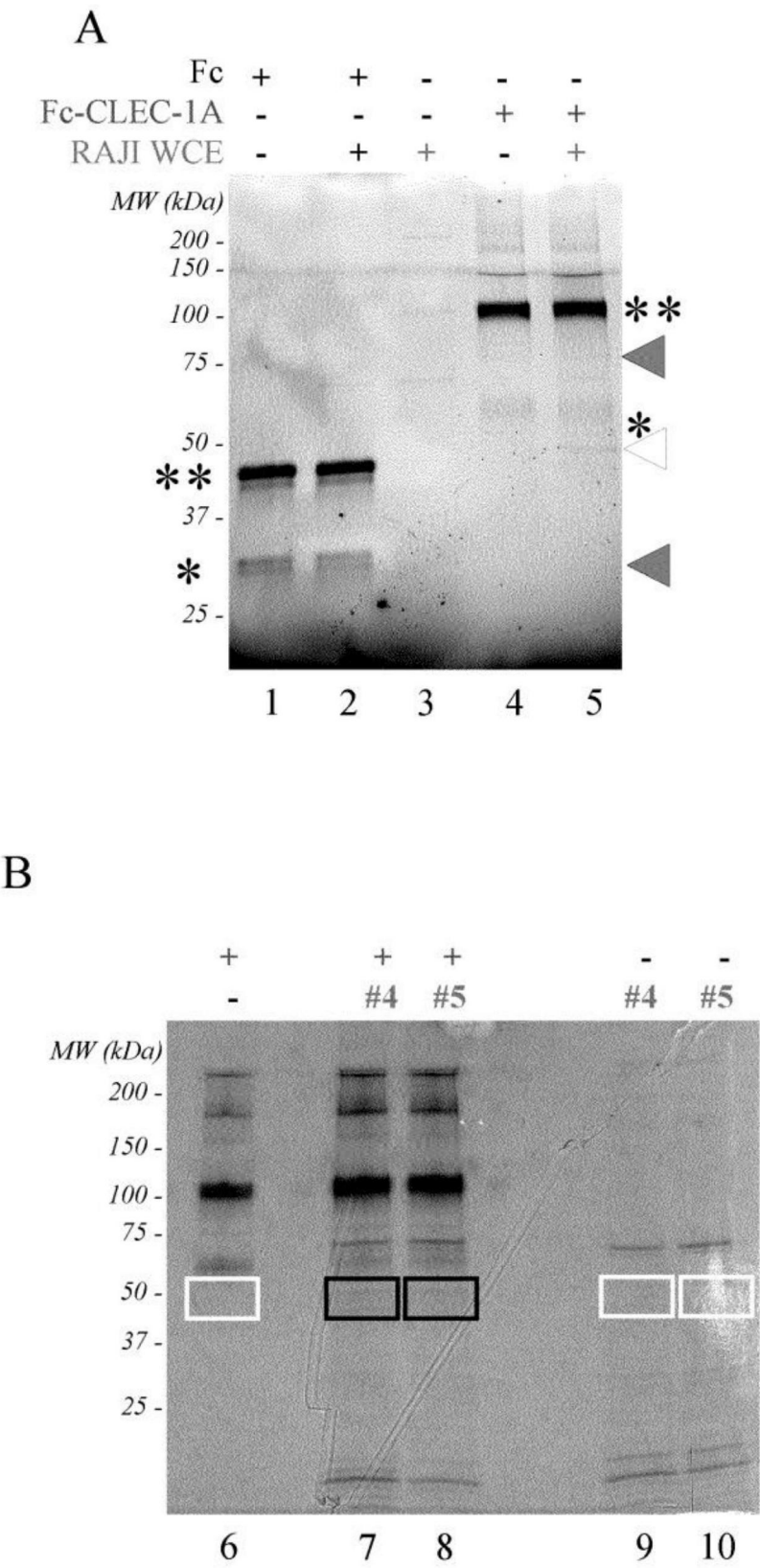


图1

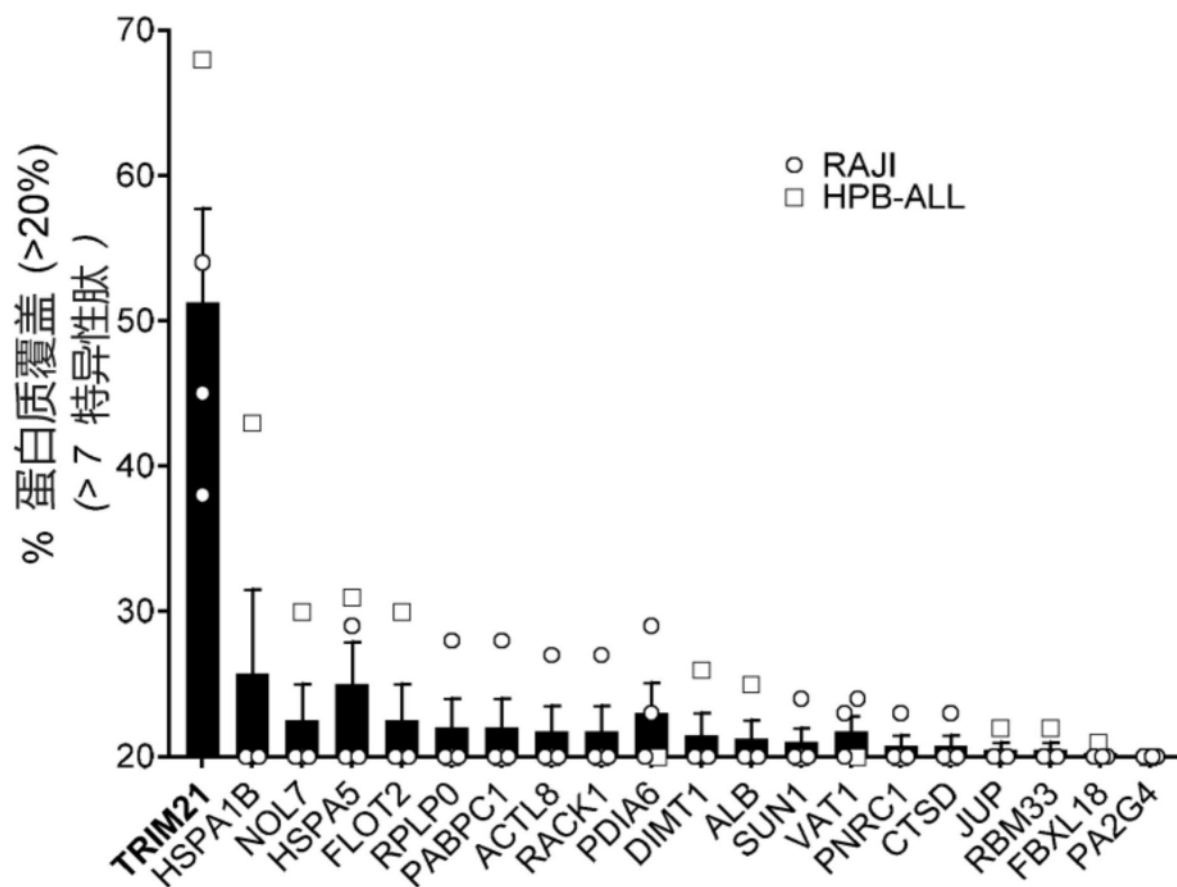


图2

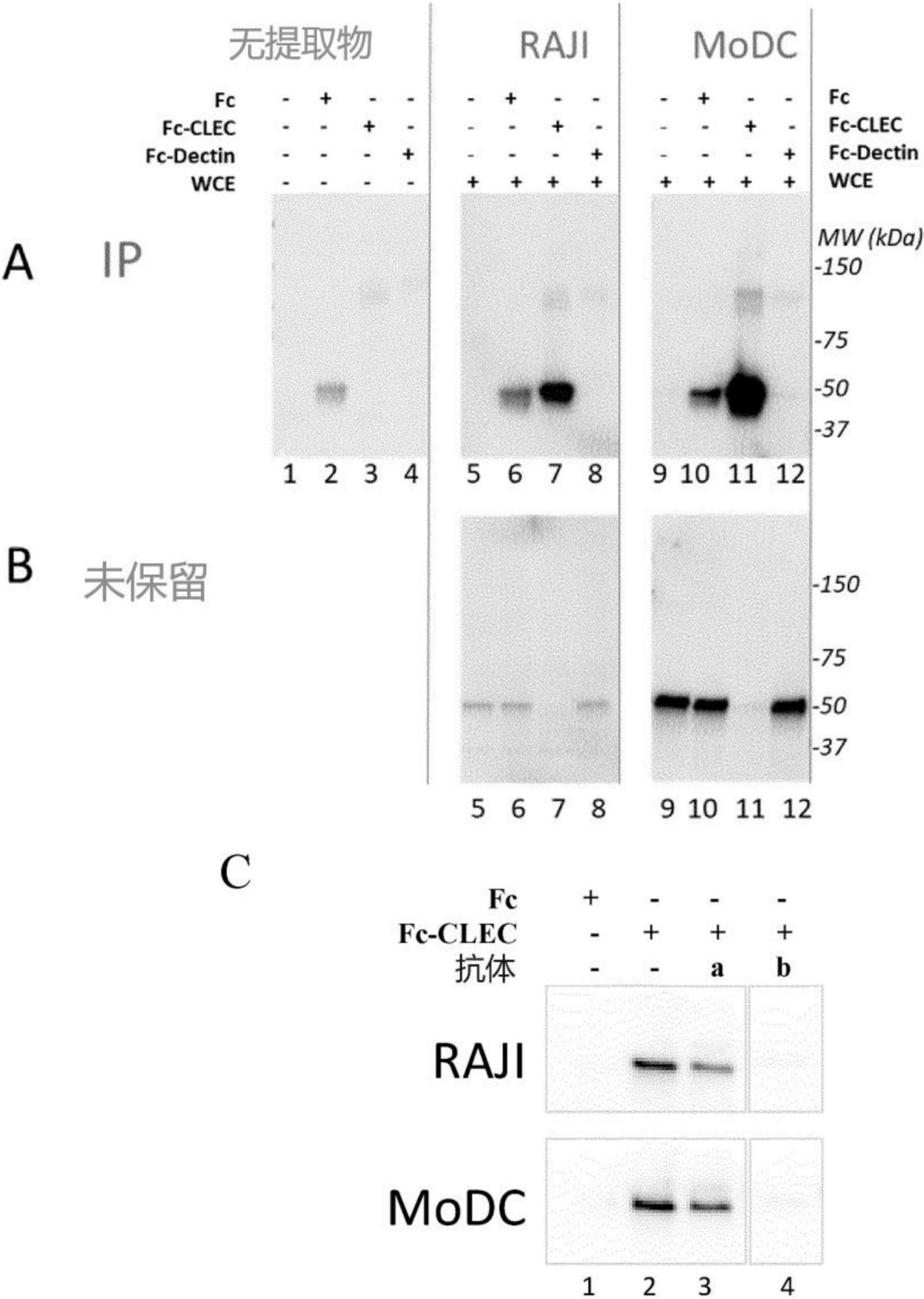


图3

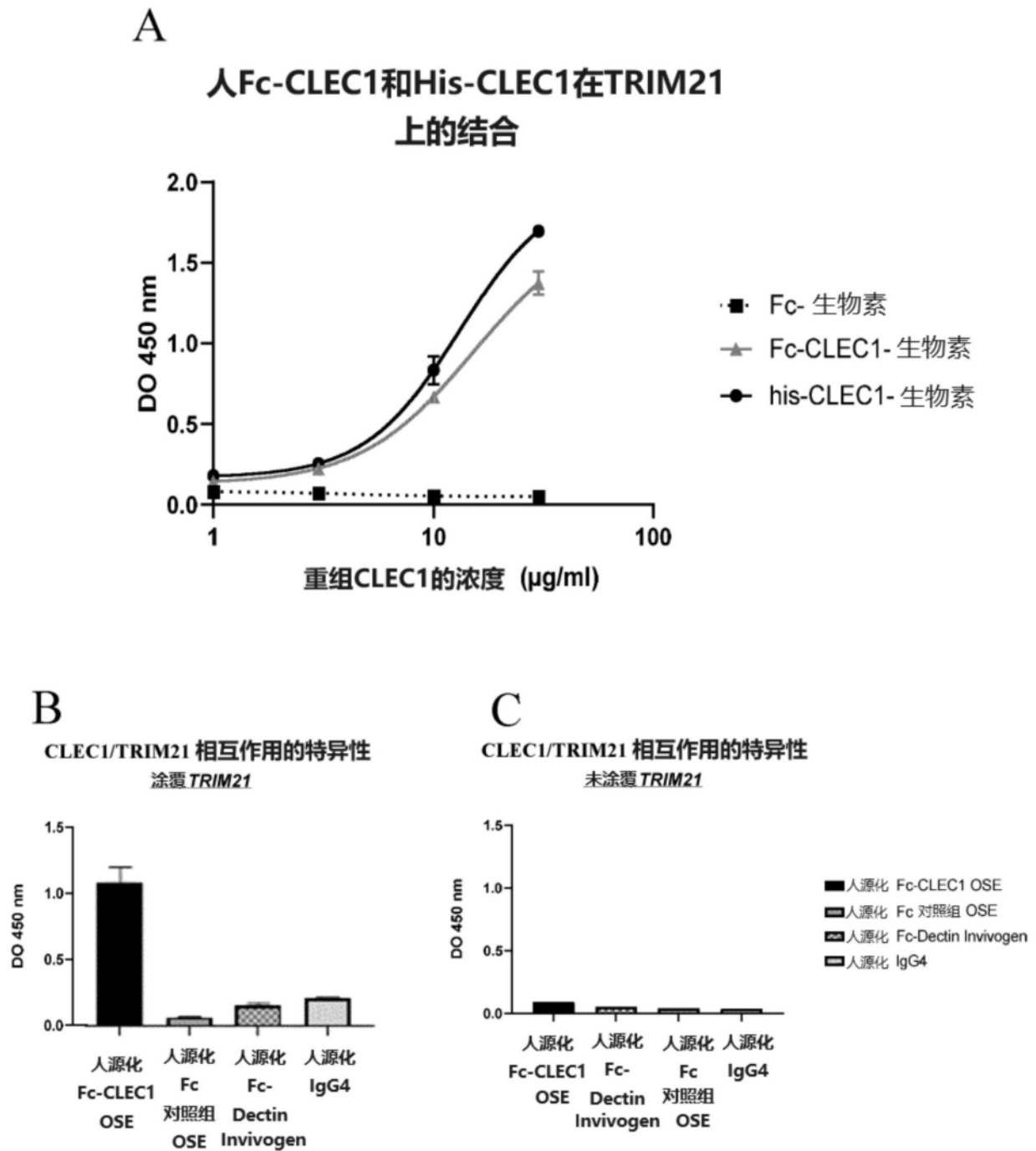
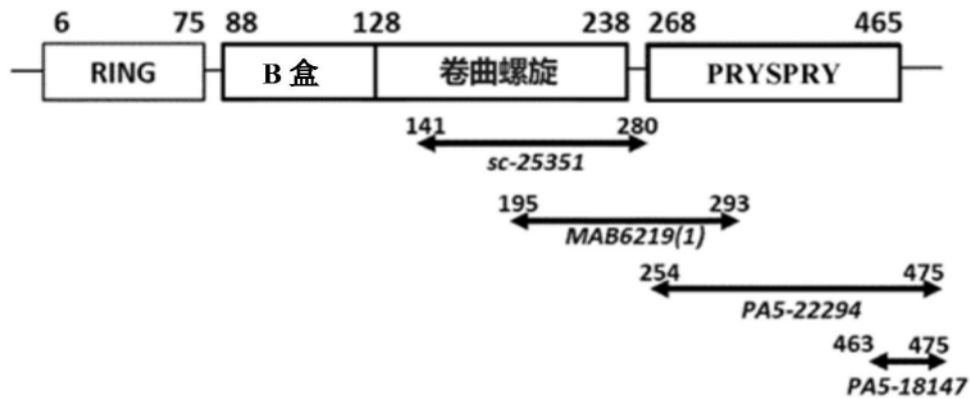


图4

A

抗TRIM-21抗体靶向的表位



B

抗TRIM21抗体对TRIM/CLEC1相互作用的拮抗活性

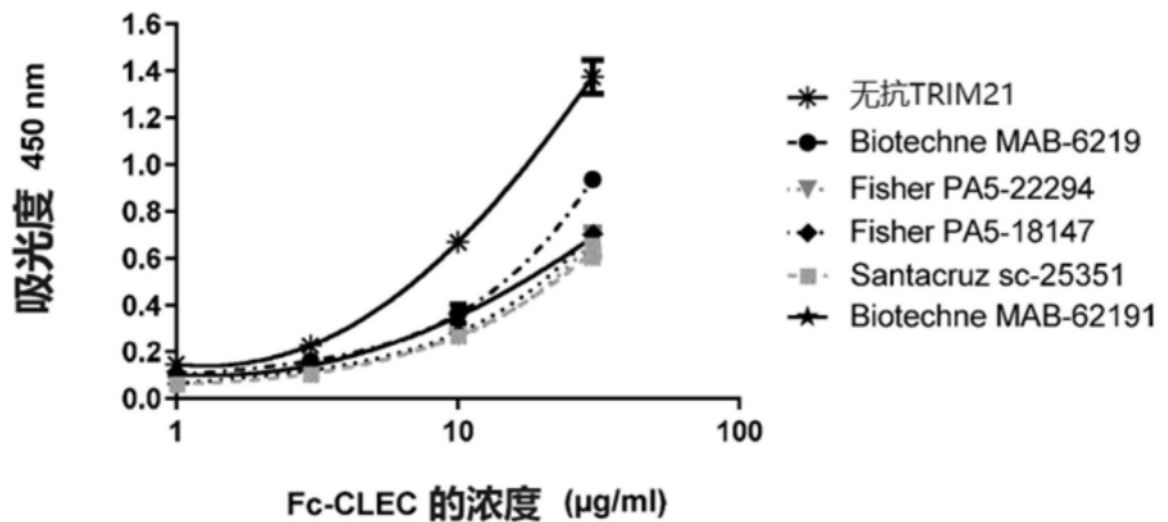


图5

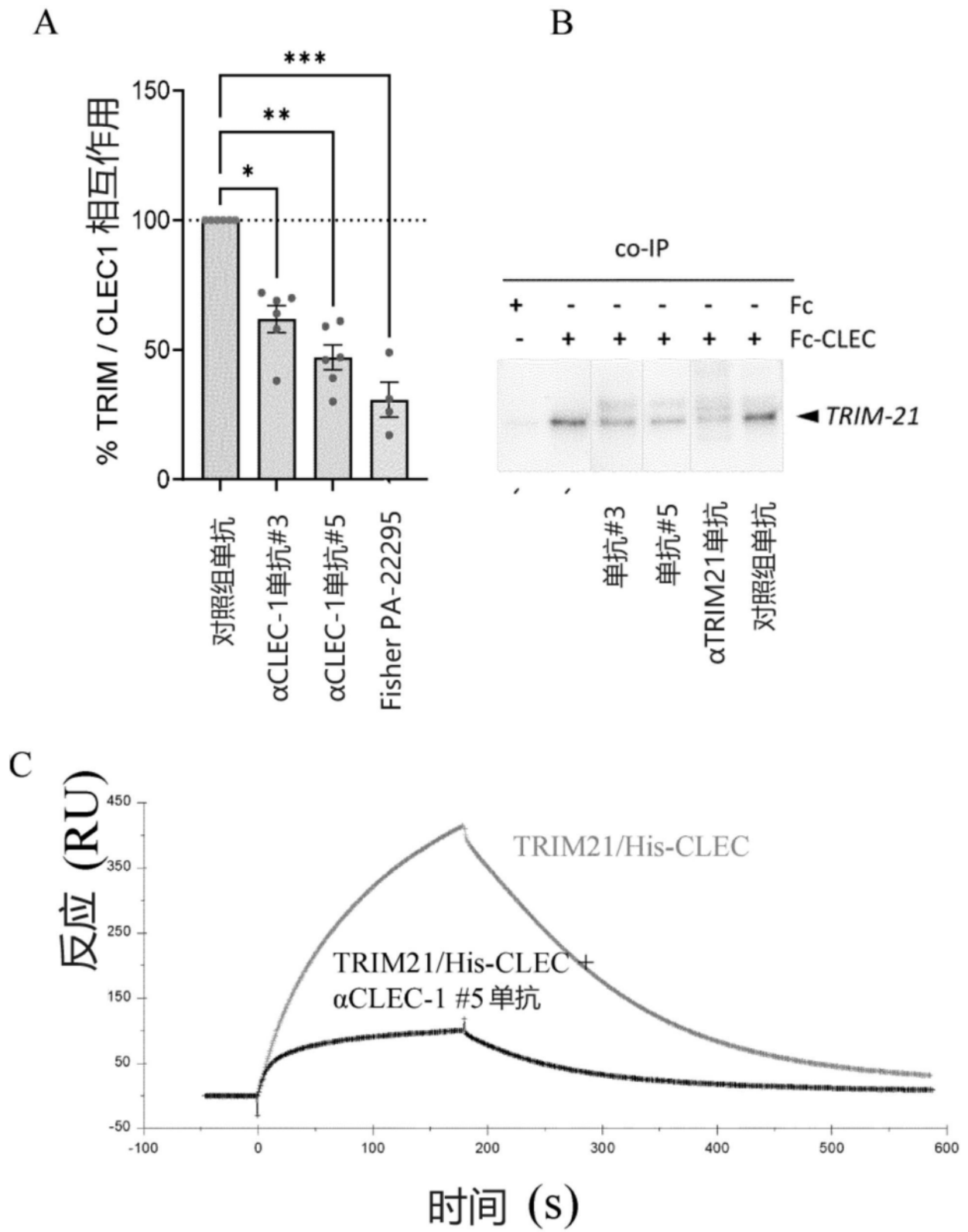


图6

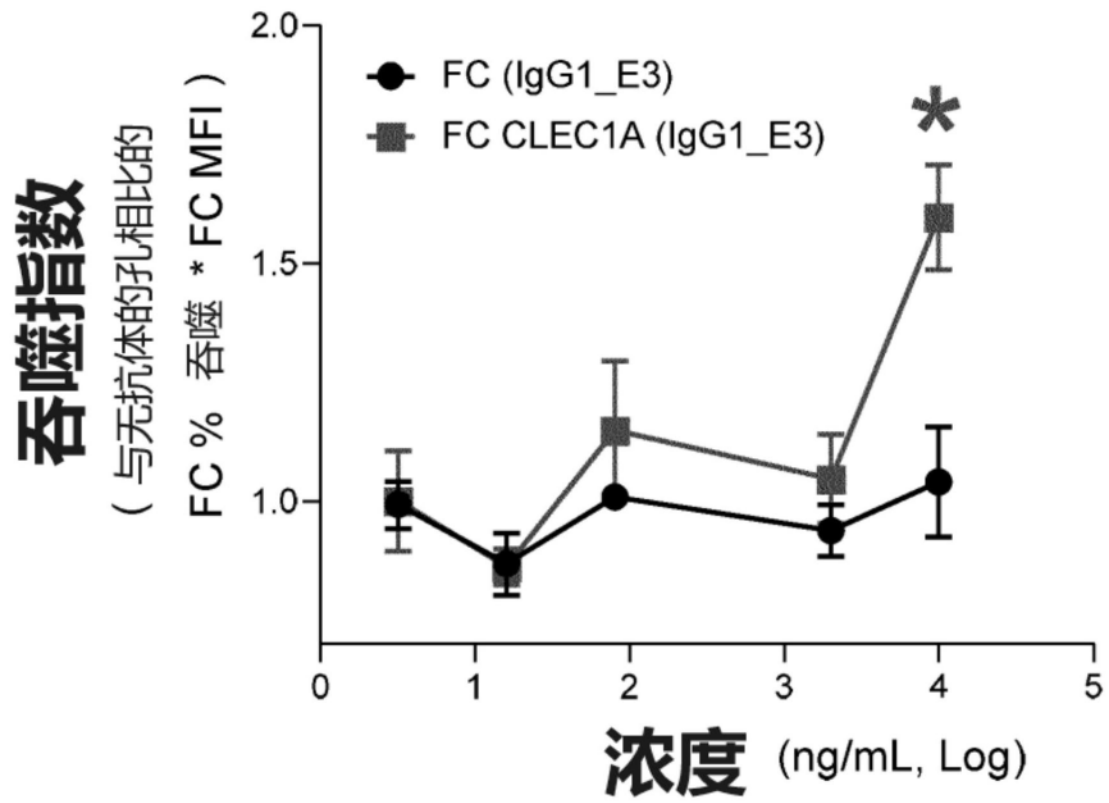


图7

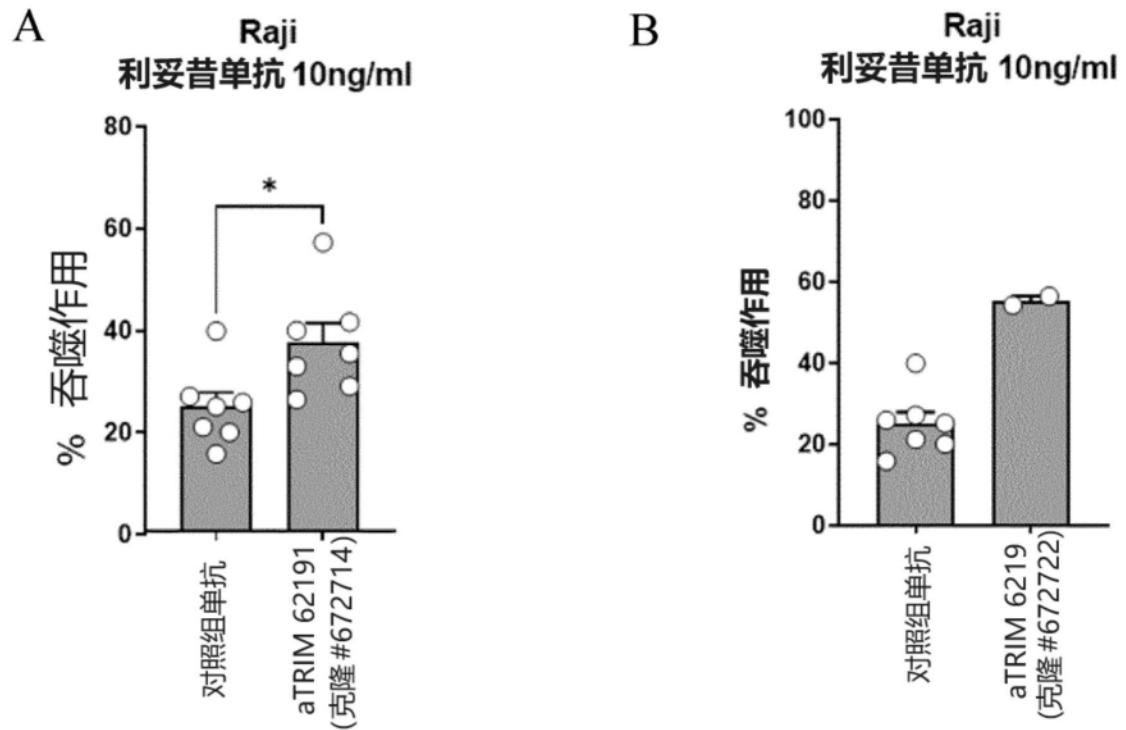
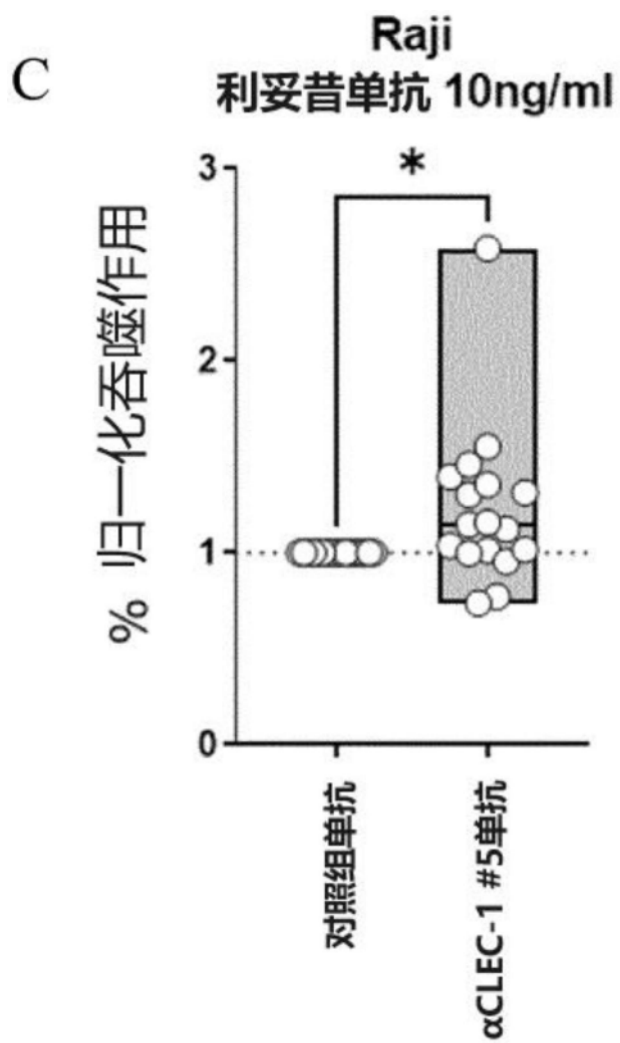


图8 (起始)

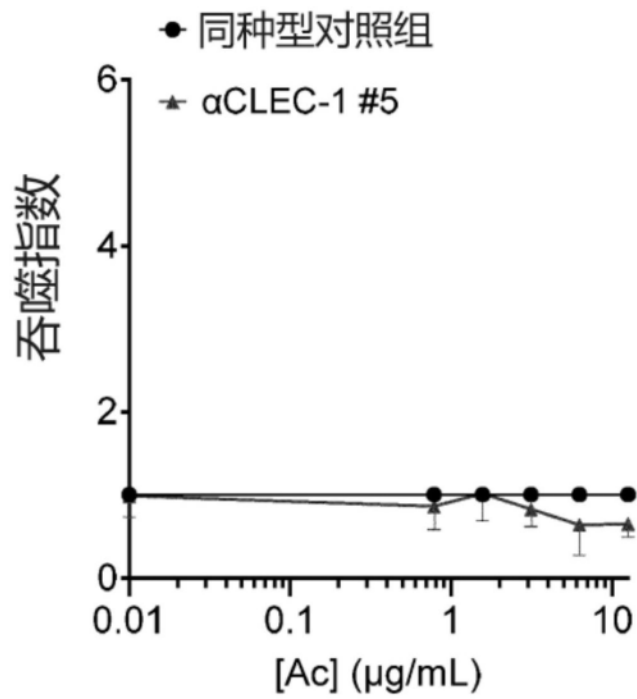
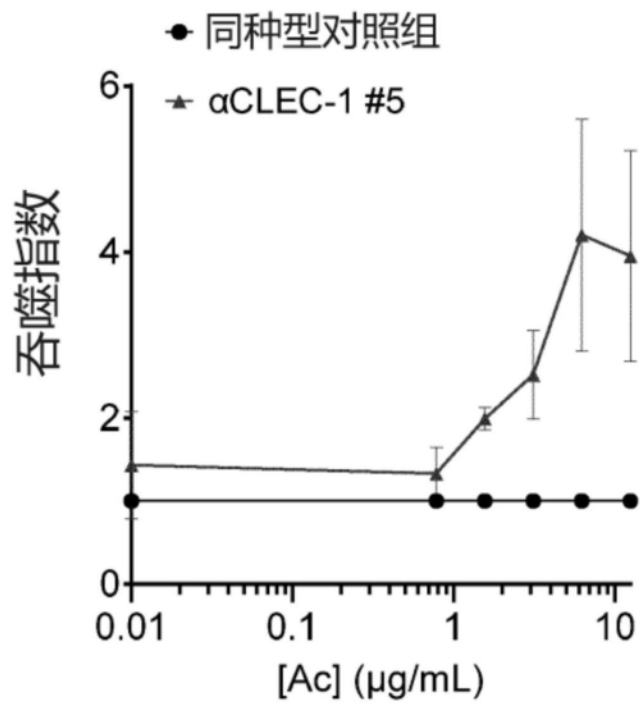


D



图8(结束)

A)

CLEC-1-/TRIM21+ 肿瘤细胞**CLEC-1+/TRIM21+ 肿瘤细胞**

B)

图9