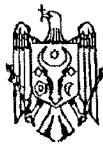




MD/EP 3529262 T2 2022.01.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3529262 (13) T2

(51) Int. Cl.:C07K 14/47 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

| | |
|---|--|
| <p>(21) Numărul de depozit: e 2019 0953</p> <p>(22) Data de depozit: 2017.10.20</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17797066.2, 2017.10.20</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3529262, 2019.08.28</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 16306381; 17305988</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.10.21; 2017.07.24</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: EP; EP</p> | <p>(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 01/2022, 2022.01.31</p> <p>(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 29/2021, 2021.07.21</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 09/2019, 2019.09.30</p> |
| <p>(71) Solicitanți: INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE, FR; UNIVERSITE DE NANTES, FR; OSE IMMUNOTHERAPEUTICS, FR</p> <p>(72) Inventatori: CHIFFOLEAU Elise, FR; TEPPAZ Géraldine, FR; POIRIER Nicolas, FR; VANHOVE Bernard, FR; GAUTTIER Vanessa, FR</p> <p>(73) Titulari: INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE, FR; UNIVERSITE DE NANTES, FR; OSE IMMUNOTHERAPEUTICS, FR</p> <p>(74) Mandatar autorizat: SOKOLOVA Sofia</p> | |

(54) Metode pentru promovarea răspunsului celulelor T

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție se referă la metode de promovare a răspunsului celulelor T. Inventatorii au examinat expresia și funcția CLEC-1 în DC umane și au demonstrat pentru prima dată o exprimare la suprafața celulei. Ei au investigat rolul său funcțional după declanșarea orchestrării răspunsurilor celulelor T. Inventatorii au arătat *in vitro* și *in vivo* cu șobolani deficienți în CLEC-1 și proteine de fuziune CLEC-1 Fc de șobolan că întreruperea semnalizării CLEC-1 îmbunătățește activarea

2

in vitro Th17 și *in vivo* îmbunătățește amorsarea celulelor T și activarea Th17 și Th1. În special, prezenta invenție se referă la antagoniștii CLEC-1 pentru promovarea răspunsului celulelor T la un subiect care are nevoie de acesta.

Secvențe: 2

Revendicări: 13

Figuri: 8

MD/EP 3529262 T2 2022.01.31

(54) Methods for promoting T cells response**(57) Abstract:**

1

The present invention relates to methods for promoting T cells response. The inventors examined the expression and function of CLEC-1 in human DCs and demonstrated for the first time a cell-surface expression. They investigated its functional role following triggering on orchestration of T-cell responses. The inventors showed in vitro and in vivo with CLEC-1 deficient rats and rat CLEC-1 Fc fusion protein that disruption of

2

CLEC-1 signalling enhances in vitro Th17 activation and in vivo enhances T cell priming and Th17 and Th1 activation. In particular, the present invention relates to CLEC-1 antagonists for promoting T cells response in a subject in need thereof.

Sequences: 2

Claims: 13

Fig.: 8

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL INVENȚIEI:**

5 Prezența invenției se referă la antagoniști ai CLEC-1 uman pentru utilizare în tratamentul cancerelor, prin promovarea răspunsului celulelor T.

CADRUL INVENȚIEI:

10 Cancerul este o preocupare majoră, deoarece este principala cauză de deces la nivel mondial, reprezentând 8,2 milioane de decese în 2012 (raportul mondial asupra cancerului, 2014, Organizația Mondială a Sănătății). De exemplu, cancerul este a doua cea mai frecventă cauză de deces din SUA, depășită doar de bolile de inimă, și reprezintă aproape 1 din 4 decese (fapte și cifre despre cancer în 2015, Societatea Americană a Cancerului). În ciuda numeroaselor tratamente existente, este încă nevoie de o metodă îmbunătățită de tratare a cancerului.

15 Răspunsurile celulelor T reprezintă un element cheie al răspunsurilor imune antitumorale. Răspunsul antitumoral al celulelor T rămâne puțin cunoscut, dar mai multe studii au arătat că răspunsurile citotoxice de tip CD8 și CD4 de tip helper joacă un rol esențial (Mutz, GT și Coukos, G (2013). Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* 39: 61-73) (Bos, R și Sherman, LA (2010). Ajutorul celulelor T CD4+ în mediul tumoral este necesar pentru recrutarea și funcția citotoxică a limfocitelor T CD8+. *Cancer Res* 70: 8368-8377) (Tosolini, M, și colab. (2011). Clinical impact of
20 different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 71: 1263-1271). Mai mult decât atât, celulele Th17 conduc răspunsurile imune antitumorale prin recrutarea celulelor imune în tumori, activarea celulelor T CD8+ efectoare, sau chiar direct prin conversia către fenotipul Th1 și producerea de IFN- γ (Th17 Cell Plasticity and Functions in *Cancer Immunity*, Leslie Guéry and Stéphanie Hugues, *BioMed Research International*, Volumul 2015
25 (2015)).

Printre cele mai promițătoare abordări pentru activarea imunității terapeutice antitumorale se numără blocada punctelor de control imune. Punctele de control imune se referă la o mulțime de căi inhibitorii conectate la sistemul imunitar care sunt cruciale pentru menținerea autotoleranței și pentru a
30 minimiza deteriorarea colaterală a țesuturilor. Acum este clar că tumorile cooptează anumite căi ale punctului de control imun, în special prin intermediul celulelor mioide ca mecanism major de rezistență imună (Couzin-Frankel 2013; De Henau, Rausch și colab. 2016). În ultimii ani, acumularea de dovezi demonstrează că tumorile utilizează procese fiziologice ale receptorilor inhibitori de lectină de tip C (CLR-uri), în special cei implicați în vindecarea rănilor, pentru a suprima activarea celulelor mioide și a promova eschivarea imunitară. CLR-urile au particularitatea de a recunoaște glicozilarea anormală de
35 către celulele tumorale, dar și liganzi mai diversificați, cum ar fi lipidele, proteinele sau DAMP-urile eliberate de celulele pe moarte (Geijtenbeek și Gringhuis 2009; Yan, Kamiya și colab. 2015). Mai multe studii experimentale demonstrează că CLR-urile contribuie la progresia cancerului și la răspândirea metastatică prin funcția lor în aderența celulelor sau în modelarea răspunsului celulelor T (Yan, Kamiya și colab. 2015; Ding, Yao și colab. 2017). De exemplu, s-a demonstrat că receptorii imunomodulatori DC-SIGN, MINCLE, DCIR și BDCA-2 inhibă activarea celulelor mioide, inflamația, și sunt critici pentru a
40 conduce extinderea Tregs Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ (Yan, Kamiya și colab. 2015; Ding, Yao și colab. 2017). DC-SIGN recunoaște antigenul carcinoembrionar supraexprimat pe aproape tot carcinomul uman (Nonaka, Ma și colab. 2008) și promovează secreția citokinelor imunosupresoare IL-10 și IL-6 de către celulele mioide. În plus, s-a constatat că polimorfismele din promotorul genei DC-SIGN sunt asociate
45 cu un risc crescut la pacienții cu cancer colorectal (Lu, Bevier și colab. 2013). MINCLE s-a dovedit a fi îmbunătățit în leucocitele infiltrante tumorale în adenocarcinomul ductal pancreatic și mai ales în celulele mioide supresive (MSC). Ligarea MINCLE cu SAPI30 (o subunitate a complexului histonă-deacetilază) eliberată din celulele pe moarte induce o supresie peri-tumorală puternică (Seifert, Werba și colab. 2016). În mod similar, CLR LOX-1 s-a dovedit a fi îmbunătățit în mod specific la suprafața
50 celulară a sângelui sau neutrofilelor care se infiltrază în tumori (15 până la 50%) la pacienții cu cancer, în timp ce este aproape nedetectabil în sângele donatorilor sănătoși (Condamine, Dominguez și colab. 2016). În acest studiu, s-a arătat că stresul reticulului endoplasmatic induce expresia de LOX-1 și convertește neutrofilele în CSM cu funcție supresivă puternică. În schimb, s-a demonstrat că declanșarea semnalizării activării de CLR, cum ar fi DECTIN-1, crește imunitatea anti-tumorală și scade Tregs și
55 MSC (Tian, Ma și colab. 2013). Administrarea beta-glucanilor, un ligand al DECTIN-1 inhibă creșterea tumorii în modelele de carcinom murin (Li, Cai și colab. 2010; Masuda, Inoue și colab. 2013; Tian, Ma și colab. 2013), în melanomul uman, neuroblastom, modele xenogrefe de limfom (Modak, Koehne și colab. 2005), precum și în cancerul ovarian și gastric uman (Inoue, Tanaka și colab. 1993; Oba, Kobayashi și colab. 2009). Prin urmare, țintirea de CLR-uri inhibitoare care sunt induse în mod special în acest

microambient reprezintă o strategie terapeutică promițătoare pentru a spori activarea celulelor mieloide și imunitatea anti-tumorală.

În trecut, inventatorii au identificat receptorul-1 de tip lectină de tip C (CLEC-1) pentru a fi reglat în sus într-un model de toleranță la alorefe la rozătoare (Thebault, Lhermite și colab. 2009). CLEC-1 aparține grupului DECTIN-1 al receptorilor asemănători lectinei de tip C (Plato, Willment și colab. 2013) și, deși identificat cu mult timp în urmă, liganzii și semnalizarea rămân necaracterizate. CLEC-1 aparține grupului de CTLR DECTIN-1, inclusiv CLEC-2, DECTIN-1, CLEC-9A, MICL, MAH și LOX-1 și, deși identificat cu mult timp în urmă (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), liganzii, semnalizarea în aval și efectele biologice rămân necaracterizate. CLEC-1 nu conține un motiv de activare pe bază de imunoreceptor de tirozină (ITAM) sau un motiv inhibitor (ITIM) în coada citoplasmatică, ci mai degrabă un reziduu de tirozină într-o secvență de semnalizare necaracterizată (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). Cu toate acestea, nu se știe dacă acest motiv este supus fosforilării sau dacă CLEC-1 necesită, ca pentru alte CTLR-uri, un lanț adaptor pentru expresie și semnalizare stabilă. CLEC-1 conține și ca Dectin-1, DC-SIGN sau CLEC-2, un motiv tri-acid [DDD]. Interesant, acest motiv tri-acid a fost demonstrat pentru Dectin-1 că modulează activitatea Raf-1 și pentru a reprima calea NF-κB dependentă de proteina 9 (Card9) care conține domeniu de recrutare Caspază indusă de majoritatea CTLR-urilor pentru a reprograma setul de citokinele secretate și echilibrul diferențierii celulare Th1 și Th17 ulterioare (Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, și colab. 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). Foarte puține au fost descrise până acum cu privire la expresia, reglarea și funcția proteinei CLEC-1 umane. Există o singură publicație despre expresia CLEC-1 care dezvăluie că CLEC-1 uman ar putea fi detectat doar intracelular în celulele endoteliale cu un model de colorare asemănător proteinelor reticulului endoplasmatic, și că nici TGF-β, nici stimulii inflamatori nu ar putea promova o translocție semnificativă la suprafața celulei. (Receptorul CLEC-1 asemănător lectinei de tip C uman este reglat în sus de TGF-β și localizat în principal în compartimentul membranei endoplasmatică. Sattler și colab., ScandJImmunol. 2012 mar; 75 (3): 282-92). Astfel, singurele informații disponibile în stadiul tehnicii privind hCLEC-1 (adică, localizarea intracelulară în celulele endoteliale) este contrar la ceea ce se știa la șobolan (adică; rCLEC-1 localizat pe suprafața celulelor endoteliale și mieloide).

Inventatorii prezenți au arătat pentru prima dată că CLEC-1 este exprimat la suprafața celulei prin DC-uri convenționale (CDC) și prin mici subseturi de monocite și DC-urile din sângele uman și este îmbunătățit de citokina imunosupresivă TGFβ. Ei au demonstrat atât la rozătoare, cât și la oameni, că CLEC-1 acționează ca un receptor inhibitor în celulele mieloide și previne expresia de IL12p40 și răspunsurile Th1 și Th17 *in vivo* din aval.

De asemenea, au arătat că proliferarea celulelor T umane și IFN-gamma umană sunt crescute folosind anticorpi anti-hCLEC-1 ca antagoniști ai CLEC-1. Ei au demonstrat, de asemenea, că șoarecii deficienți în CLEC-1 sunt mai bine rezistenți la creșterea tumorii și prezintă o rată de supraviețuire crescută într-un model de șoarece cu hepatocarcinom. Inventatorii au arătat că CLEC-1 uman este exprimat prin macrofage pro-tumorale de tip M2, prin celule mieloide din mezoteliom de efuziune pleurală și din ascită tumorală ovariană. Prin urmare, CLEC-1 ca receptor de suprafață celulară poate reprezenta un instrument terapeutic util pentru a spori imunitatea anti-tumorală într-un cadru clinic.

45 REZUMATUL INVENȚIEI:

Prezenta invenție se referă la antagoniști ai CLEC-1 uman pentru utilizare în tratamentul cancerelor, prin promovarea răspunsului celulelor T. În special, invenția este definită de revendicări.

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI:

În mod surprinzător, inventatorii au examinat expresia și funcția CLEC-1 în DC umane și au demonstrat pentru prima dată o expresie de suprafață celulară. Inventatorii au arătat, de asemenea, la om, că h-CLEC-1 este exprimat prin macrofage pro-tumorale de tip M2, de celule mieloide din mezoteliom de efuziune pleurală și din ascită tumorală ovariană. Ei au investigat rolul său funcțional după declanșarea orchestrării răspunsurilor celulelor T.

În plus, au investigat *in vitro* și *in vivo*, cu șobolani deficienți de CLEC-1 și proteine de fuziune CLEC-1 Fc de șobolan, consecința întreruperii semnalizării CLEC-1 asupra funcției DC și a imunității celulelor T în aval. Întreruperea semnalizării CLEC-1 îmbunătățește activarea de Th17 *in vitro* și, *in vivo*, îmbunătățește primarea celulelor T și activarea de Th17 și Th1. Rezultatele lor indică în mod clar că CLEC-1 în DC inhibă gradul și calitatea activării celulelor Th17 și Th1 în aval și, ca receptor de suprafață celulară, poate oferi un instrument terapeutic pentru a manipula răspunsul celulelor T. Inventatorii au arătat, de asemenea, că proliferarea celulelor T umane și IFN-gamma umană sunt crescute folosind anticorpi anti-hCLEC-1 ca antagoniști ai CLEC-1. Ei au demonstrat, de asemenea, că șoarecii

deficienți în CLEC-1 sunt mai rezistenți la creșterea tumorii și prezintă o rată de supraviețuire crescută într-un model de șoareci cu hepatocarcinom. Rezultatele arată că CLEC-1 joacă rolul de receptor inhibitor în celulele mieloide prin creșterea pragului de activare. Inactivarea de CLEC-1 crește proliferarea celulelor T și polarizarea de Th1 și Th17.

5 În consecință, un prim aspect al prezentei invenții se referă la antagoniștii ai CLEC-1 uman pentru utilizare în tratamentul cancerelor, prin promovarea răspunsului celulelor T la un subiect care are nevoie de acesta, cuprinzând administrarea la subiect a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un antagonist al CLEC -1.

Utilizarea conform invenției este pentru tratarea unui subiect care suferă de cancer.

10 Un alt aspect al prezentei invenții se referă la o compoziție, în special o compoziție farmaceutică, care cuprinde antagonistul CLEC-1 al invenției.

Așa cum este utilizat aici, termenul „celule T” are sensul său general în domeniu și se referă la limfocitul T, care este un tip de limfocit care are un receptor de celule T pe suprafața celulei și joacă un rol central în imunitatea mediată de celule.

15 Așa cum este utilizat aici, termenul „răspuns al celulelor T” se referă la orice proces biologic care implică proliferarea celulelor T și / sau sinteza citokinelor.

Răspunsul celulelor T poate fi determinat prin diferite metode bine cunoscute de la un specialist în domeniu prin evaluarea proliferării celulelor T și / sau sinteza citokinelor. Într-o variantă de realizare, răspunsul celulelor T este determinat prin efectuarea unei reacții leucocitare mixte (MLR) constând din celule T purificate, izolate din sânge periferic, amestecate cu celule dendritice alogene derivate din monocite care exprimă CLEC-1. Proliferarea celulelor T poate fi evaluată prin diluția succinimidil esterului carboxifluoresceină și expresia IFN γ poate fi evaluată prin citometrie în flux în celulele T și prin ELISA la supernatanți.

25 Așa cum este utilizat aici, termenul „subiect” desemnează un mamifer, cum ar fi un rozător, o felină, un canin și un primat. De preferință, un subiect conform invenției este un om.

Termenii „cancer” își au semnificația generală în domeniu și se referă la un grup de boli care implică creșterea celulară anormală cu potențialul de a invada sau a se răspândi în alte părți ale corpului. Termenul „cancer” mai cuprinde atât cancerele primare, cât și cele metastatice. Exemple de cancer care pot fi tratate prin metode și compoziții conform invenției includ, dar nu se limitează la, celule canceroase din vezică, sânge, os, măduvă osoasă, creier, sân, colon, esofag, gastrointestinal, gingie, cap, rinichi, ficat, plămân, nazofaringe, gât, ovar, prostată, piele, stomac, testicul, limbă sau uter. În plus, cancerul poate fi în mod specific de următorul tip histologic, deși nu se limitează la acestea: neoplasm, malign; carcinom; carcinom cu nediferențiat; carcinom cu celule uriașe și fusiforme; carcinom cu celule mici; carcinom papilar; carcinom cu celule scuamoase; carcinom limfoepitelial; carcinom bazocelular; carcinom pilomatrix; carcinom cu celule de tranziție; carcinom cu celule tranzitorii papilare; adenocarcinom; gastrinom, malign; colangiocarcinom; carcinom hepatocelular; carcinom hepatocelular combinat și colangiocarcinom; adenocarcinom trabecular; carcinom chistic adenoid; adenocarcinom în polipul adenomatos; adenocarcinom, coli polipoză familială; carcinom solid; tumoare carcinoasă, malignă; adenocarcinom bronchiolo-alveolar; adenocarcinom papilar; carcinom cromofob; carcinom acidofil; adenocarcinom oxifilic; carcinom bazofil; adenocarcinom cu celule clare; carcinom cu celule granulare; adenocarcinom folicular; adenocarcinom papilar și folicular; carcinom sclerozant necapsulant; carcinom cortical suprarenal; carcinom endometroid; carcinom cu apendice cutanate; adenocarcinom apocrin; adenocarcinom sebaceic; adenocarcinom ceruminos; carcinom mucoepidermoid; cistadenocarcinom; cistadenocarcinom papilar; cistadenocarcinom seros papilar; cistadenocarcinom mucinos; adenocarcinom mucinos; carcinom cu celule inelare; carcinomul canalelor infiltrante; carcinom medular; carcinom lobular; carcinom inflamator; boala paget, mamară; carcinom cu celule acinare; carcinom adenoscuamos; adenocarcinom cu metaplazie scuamoasă; timom, malign; tumoare stromală ovariană, malignă; tecom, malign; tumoare cu celule granuloase, malignă; și roblastom, malign; carcinom cu celule Sertoli; tumoare cu celule leydig, malignă; tumoare cu celule lipidice, malignă; paragangliom, malign; paragangliom extra-mamar, malign; feocromocitom; glomangiosarcom; melanom malign; melanom amelanotic; melanom cu răspândire superficială; melanom malign în nevul pigmentat gigant; melanom celular epitelioid; nevus albastru, malign; sarcom; fibrosarcom; histiocitom fibros, malign; mixosarcom; liposarcom; leiomiomasarcom; rabdomiosarcom; rabdomiosarcom embrionar; rabdomiosarcom alveolar; sarcom stromal; tumoare mixtă, malignă; tumoare mixtă mulleriană; nefroblastom; hepatoblastom; carcinosarcom; mezenchimom, malign; brennertumor, malign; filodestumor, malign; sarcom sinovial; mezoteliom, malign; disgerminom; carcinom embrionar; teratom, malign; strumaovarîi, malign; coriocarcinom; mezonefom, malign; hemangiosarcom; hemangioendoteliom, malign; sarcomul kaposi; hemangiopericitom, malign; limfangiosarcom; osteosarcom; osteosarcom juxtacortical; condrosarcom; condroblastom, malign; condrosarcom mezenchimal; tumoră osoasă cu celule uriașe; sarcomul ewing; tumoare odontogenă, malignă; ameloblasticodontosarcom; ameloblastom, malign; fibrosarcom ameloblastic; pinealom, malign; cordon; gliom, malign; ependimom; astrocitom; astrocitom

protoplasmatic; astrocitom fibrilar; astroblastom; glioblastom; oligodendrogliom; oligodendroblastom; neuroectodermic primitiv; sarcom cerebelos; ganglioneuroblastom; neuroblastom; retinoblastom; tumoare neurogenă olfactivă; meningiom, malign; neurofibrosarcom; neurilemom, malign; tumoare cu celule granulare, malignă; limfom malign; Boala Hodgkin; Limfomul lui Hodgkin; paraganulom; limfom malign, limfocitar mic; limfom malign, cu celule mari, difuz; limfom malign, folicular; micoza fungoidelor; alte limfoame non-Hodgkin specificate; histiocitoză malignă; mielom multiplu; sarcomul mastocitar; boala intestinului subțire imunoproliferativă; leucemie; leucemie limfoidă; leucemie cu celule plasmatică; eritroleucemie; leucemie cu celule de limfosarcom; leucemie mieloidă; leucemie bazofilă; leucemie eozinofilă; leucemie monocitică; leucemie mastocitară; leucemie megacarioblastică; sarcom mieloid; și leucemie cu celule păroase.

În unele exemple de realizare, subiectul suferă de un cancer selectat din grupul format din cancerul căilor biliare, cancerul vezicii urinare, cancerul oaselor, cancerul cerebral și al sistemului nervos central, cancerul mamar, cancerul cervical al bolii Castleman, cancerul colorectal, cancerul endometrial, cancerul esofagian, cancer al vezicii biliare, tumori carcinoide gastro-intestinale, boala Hodgkin, limfom non-Hodgkin, sarcom Kaposi, cancer la rinichi, cancer laringian și hipofaringian, cancer la ficat, cancer pulmonar, mezoteliom, plasmacitom, cancerul de cavitate nazală și sinusul paranasal, cancerul nazofaringian și cancer orofaringian, cancer ovarian, cancer pancreatic, cancer al penisului, cancer hipofizar, cancer de prostată, retinoblastom, rhabdomyosarcom, cancer de glandă salivară, cancer de piele, cancer de stomac, cancer testicular, timus, cancer tiroidian, cancer vaginal, cancer vulvar și cancer uterin. Într-un exemplu de realizare, cancerul este cancer hepatic. Într-un exemplu de realizare, cancerul este hepatocarcinom.

Într-un exemplu de realizare, cancerul este cancer ovarian. Într-un exemplu de realizare, cancerul este gliom. Așa cum este utilizat aici, „tratament” sau „tratare” este o abordare pentru obținerea rezultatelor benefice sau dorite, inclusiv a rezultatelor clinice. În scopul acestei invenții, rezultatele clinice benefice sau dorite includ, dar nu se limitează la, unul sau mai multe dintre următoarele: ameliorarea unuia sau mai multor simptome rezultate din boală, diminuarea extinderii bolii, stabilizarea bolii (de exemplu, prevenirea sau întârzierea înrăutățirii bolii), prevenirea sau întârzierea răspândirii bolii, prevenirea sau întârzierea reapariției bolii, întârzierea sau încetinirea progresiei bolii, ameliorarea stării bolii, oferind o remisiune (parțială sau totală) a bolii, scăderea dozei unuia sau mai multor alte medicamente necesare pentru tratarea bolii, întârzierea progresiei bolii, creșterea calității vieții și / sau prelungirea supraviețuirii. Termenul „tratament” cuprinde tratamentul profilactic. Așa cum este utilizat aici, termenul „a preveni” se referă la reducerea riscului de a dobândi sau a dezvolta o anumită afecțiune. Așa cum este utilizat aici, termenul „CLEC-1” are semnificația sa generală în domeniu și se referă la receptorul-1 similar lectinei de tip C, în special de la o specie de mamifer, mai ales CLEC-1 uman. CLEC-1 aparține grupului DECTIN-1 de receptori de tip C-lectină (CTLR-uri), inclusiv CLEC-2, DECTIN-1, CLEC-9A, MICL, MAH și LOX-1. De preferință, termenul „CLEC-1 uman” se referă la proteina secvenței de aminoacizi la care se face referire prin numărul de accesare Uniprot Q8NC01 și codificată de gena CLEC1A la care se face referire prin numărul de acces 51267 NCBI.

În special, antagonistul lui CLEC-1 este un antagonist al CLEC-1 uman. Așa cum este utilizat aici, termenul „antagonist de CLEC-1” are semnificația sa generală în domeniu și se referă la orice compus, natural sau sintetic, care blochează, suprimă sau reduce activitatea biologică a lui CLEC-1. În special, antagonistul lui CLEC-1 inhibă interacțiunile dintre receptorul CLEC-1 și cel puțin unul dintre liganzii săi, mai ales toți liganzii săi. Mai particular, antagonistul lui CLEC-1 se poate lega de receptorul de CLEC-1 sau de oricare dintre liganzii săi. Antagonistul lui CLEC-1 îmbunătățește răspunsul celulelor T, în special crește proliferarea celulelor T și / sau sinteza citokinelor, cum ar fi IFN γ . De exemplu, antagonistul lui CLEC-1 poate fi identificat prin următoarea metodă care cuprinde etapele constând din:

- a) furnizarea unei pluralități de celule care exprimă CLEC-1 pe suprafața lor;
- b) incubarea respectivelor celule cu un compus candidat;
- c) determinarea dacă respectivul compus candidat se leagă și blochează, suprimă sau reduce activitatea biologică a lui CLEC-1 și, în special, dacă respectivul candidat promovează răspunsul celulelor T;
- și d) selectarea compusului candidat care se leagă și blochează, suprimă sau reduce activitatea biologică a lui CLEC-1 și, în special, promovează răspunsul celulelor T.

Termenul „moleculă organică mică” se referă la o moleculă de o dimensiune comparabilă cu acele molecule organice utilizate în general în produse farmaceutice. Termenul exclude macromoleculele biologice (de exemplu, proteine, acizi nucleici etc.). Moleculele organice mici preferate au o dimensiune de până la aproximativ 5000 Da, mai ales până la 2000 Da și, în special, până la aproximativ 1000 Da.

În unele exemple de realizare, antagonistul de CLEC-1 este un anticorp sau un fragment de legare a antigenului acestuia. În unele exemple de realizare, antagonistul de CLEC-1 este un anticorp sau un fragment de legare a antigenului acestuia care se leagă în mod specific de CLEC-1.

Așa cum este utilizat aici, termenul „se leagă în mod specific de” sau „se leagă în mod specific” se referă la capacitatea unui receptor de antigen de a se lega de un antigen cu o afinitate de cel puțin

aproximativ 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, sau mai mult, și / sau se leagă de o țintă cu o afinitate care este de cel puțin două ori mai mare decât afinitatea sa pentru un antigen nespecific.

5 Afinitatea poate fi determinată prin diferite metode bine cunoscute de la un specialist în domeniu. Aceste metode includ, dar nu se limitează la, analiza Biacore, analiza Blitz și diagramă Scatchard. Într-un exemplu de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia conform invenției are o valoare KD inferioară sau egală cu 10^{-8} M, de preferință inferioară sau egală cu 10^{-9} M pentru CLEC-1, în special pentru CLEC-1 uman, mai preferabil inferioară sau, egală cu $1 \cdot 10^{-10}$ M, după cum se poate determina prin analiza biosenzorului, în special prin analiza Biacore. În unele exemple de realizare, antagonistul de CLEC-1, în special anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia conform invenției se leagă în mod specific de domeniul extracelular al CLEC-1, în special al CLEC-1 uman. Într-un exemplu de realizare, secvența de aminoacizi a domeniului extracelular al lui CLEC-1 uman este
 10 YYQLSNTGQDTISQMEERLGNLSQELQSLQVQNIKLAGSLQHVAEKLCRELYNKAGAHRCSP
 CTEQWKWHGDNCYQFYKDSKSWEDCKYFCLSENSTMLKINKQEDLEFAASQSYSEFFYSYW
 15 TGLLRPDSGKAWLWMDGTPFTSELFHIIIDVTSRSDCVAILNGMIFSKDCKELKRCVCERRA
 GMVKPESLHVPPELGEED (SECV ID NR: 1).

Într-un exemplu de realizare, secvența de aminoacizi, care este recunoscută de antagonistul de CLEC-1, în special de anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului conform invenției, este
 20 CERRAGMVKPESLHVPPELGEED (SECV ID NR: 2).

Așa cum este utilizat aici, „anticorp” include atât anticorpi naturali, cât și anticorpi non-naturali. În mod specific, „anticorp” include anticorpi policlonali, monoclonali, recombinanți (inclusiv himerici și umanizați), bispecifici, multispecifici și modificați, precum și fragmente ale acestora care leagă antigenul monovalent și divalent. Mai mult, „anticorp” include anticorpi himerici, anticorpi complet sintetici, anticorpi cu lanț unic și fragmente ale acestora. Anticorpul poate fi un anticorp uman sau neuman. Un anticorp neuman poate fi umanizat prin metode recombinante pentru a reduce imunogenitatea acestuia la om.

Așa cum este utilizat aici, un „anticorp modificat” corespunde unei molecule care cuprinde un anticorp sau un fragment de legare a antigenului acestuia, în care respectivul anticorp sau fragmentul acestuia este asociat cu o moleculă funcțional diferită.

30 Într-un exemplu de realizare a anticorpilor sau porțiunilor acestora descrise aici, anticorpul este un anticorp monoclonal. Într-un exemplu de realizare a anticorpilor sau porțiunilor acestora descrise aici, anticorpul este un anticorp monoclonal uman complet. Într-un exemplu de realizare a anticorpilor sau porțiunilor acestora descrise aici, anticorpul este un anticorp policlonal. Într-un exemplu de realizare a anticorpilor sau porțiunilor acestora descrise aici, anticorpul este un anticorp umanizat. Într-un exemplu de realizare a anticorpilor sau porțiunilor acestora descrise aici, anticorpul este un anticorp himeric. Într-un exemplu de realizare a anticorpilor sau porțiunilor acestora descrise aici, porțiunea anticorpului cuprinde un lanț ușor al anticorpului. Într-un exemplu de realizare a anticorpilor sau porțiunilor acestora descrise aici, porțiunea anticorpului cuprinde un lanț greu al anticorpului. Într-un exemplu de realizare a anticorpilor sau porțiunilor acestora descrise aici, porțiunea anticorpului cuprinde o porțiune Fab a anticorpului. Într-un exemplu de realizare a anticorpilor sau porțiunilor acestora descrise aici, porțiunea anticorpului cuprinde o porțiune F(ab')₂ a anticorpului. Într-un exemplu de realizare a anticorpilor sau porțiunilor acestora descrise aici, porțiunea anticorpului cuprinde o porțiune Fc a anticorpului. Într-un exemplu de realizare a anticorpilor sau porțiunilor acestora descrise aici, porțiunea anticorpului cuprinde o porțiune FV a anticorpului. Într-un exemplu de realizare a anticorpilor sau porțiunilor acestora descrise aici, porțiunea anticorpului cuprinde un domeniu variabil al anticorpului. Într-un exemplu de realizare a anticorpilor sau porțiunilor acestora descrise aici, porțiunea anticorpului cuprinde unul sau mai multe domenii CDR ale anticorpului.

Anticorpii sunt preparați conform metodologiei convenționale. Anticorpii monoclonali pot fi generați folosind metoda Kohler și Milstein (Nature, 256: 495, 1975). Pentru a prepara anticorpi monoclonali utili în invenție, un șoarece sau alt animal gazdă adecvat este imunizat la intervale adecvate (de exemplu, de două ori pe săptămână, săptămânal, de două ori pe lună sau lunar) cu forme antigenice de CLEC-1. Animalului i se poate administra o „reimunizare” finală de antigen în decurs de o săptămână până la sacrificiu. Este adesea de dorit să se utilizeze un adjuvant imunologic în timpul imunizării. Adjuvanții imunologici adecvați includ adjuvant complet Freund, adjuvant incomplet Freund, alum, adjuvant Ribí, Hunter's Titermax, adjuvanți saponină precum QS21 sau Quil A sau oligonucleotide imunostimulatoare care conțin CpG. Alți adjuvanți adecvați sunt bine cunoscuți în domeniu. Animalele pot fi imunizate pe cale subcutanată, intraperitoneală, intramusculară, intravenoasă, intranasală sau alte căi. Un animal dat poate fi imunizat cu forme multiple ale antigenului pe căi multiple. Pe scurt, CLEC-1 recombinant poate fi furnizat prin expresie cu linii celulare recombinante. În special, CLEC-1 poate fi furnizat sub formă de celule umane care exprimă CLEC-1 la suprafața lor. După regimul de imunizare, limfocitele sunt izolate din splină, ganglion limfatic sau alt organ al animalului și fuzionate cu o linie

celulară adecvată de mielom folosind un agent precum polietilen glicol pentru a forma un hidridom. După fuziune, celulele sunt plasate în medii permise pentru creșterea hibridoamelor, dar nu și partenerii de fuziune, folosind metode standard, așa cum este descris (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, a 3-a edition, Academic Press, New York, 1996). După cultivarea hibridoamelor, supernatanții celulari sunt analizați pentru prezența anticorpilor cu specificitatea dorită, adică cei care leagă selectiv antigenul. Tehnicile analitice adecvate includ ELISA, citometrie în flux, imunoprecipitare și western blot. Alte tehnici de screening sunt bine cunoscute în domeniu. Tehnicile preferate sunt cele care confirmă legarea anticorpilor de antigen conformațional intact, pliat nativ, cum ar fi ELISA de nednaturare, citometria în flux și imunoprecipitarea. Într-un exemplu de realizare, antagonistul de CLEC-1 este selectat din grupul constând din anticorpi himerici, anticorpi umanizați și anticorpi monoclonali complet umani. Într-un exemplu de realizare, anticorpul invenției este un anticorp himeric, în special un anticorp himeric de șoarece / uman. Conform invenției, termenul „anticorp himeric” se referă la un anticorp care cuprinde un domeniu VH și un domeniu VL al unui anticorp non-uman, și un domeniu CH și un domeniu CL al unui anticorp uman.

În unele exemple de realizare, anticorpul este un anticorp umanizat, în special un anticorp monoclonal umanizat. Așa cum este utilizat aici, „umanizat” descrie anticorpii rezultați din specii neumane ale căror secvențe de proteine au fost modificate pentru a-și crește identitatea față de variantele de anticorpi produse în mod natural la om. Prin urmare, fiind obținuți inițial la animale, în special la rozătoare și în special la șobolani, după imunizarea animalelor și producerea de anticorpi, în special anticorpi monoclonali din hidridom, anticorpii sunt apoi modificați în secvențele lor VH și / sau VL prin substituirea reziduurilor de aminoacizi, în cadrul și opțional în plus în secvențele CDR pentru a obține anticorpi umanizați. În special, anticorpul umanizat menționat are mai puțin de 10% reziduuri de aminoacizi mutați, de preferință unul sau niciun reziduu de aminoacizi mutați, în regiuni CDR considerate individual, în raport cu regiunile CDR originale. Metodele de umanizare includ, dar nu se limitează la, cele descrise în brevetele americane U.S. Nr. 4.816.567, 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 și 5.859.205.

În unele exemple de realizare, anticorpul este un anticorp complet uman, în special un anticorp monoclonal complet uman. De asemenea, anticorpii monoclonali complet umani pot fi preparați prin imunizarea șoarecilor transgenici pentru porțiuni mari de loci cu lanț greu și ușor de imunoglobulină umană. Vezi, de exemplu, brevetele americane U.S. Nr. 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584, și referințele citate aici.

Aceste animale au fost modificate genetic astfel încât există o deleție funcțională în producerea de anticorpi endogeni (de exemplu, murini). Animalele sunt modificate în continuare pentru a conține tot sau, o parte a locului genei imunoglobulinei liniei germinale umane, astfel încât imunizarea acestor animale va duce la producerea de anticorpi complet umani la antigenul de interes. După imunizarea acestor șoareci (de exemplu, șoareci Xenomouse (Abgenix), șoareci HuMAb (Medarex / GenPharm)), anticorpii monoclonali pot fi preparați în conformitate cu tehnologia standard de hidridom. Acești anticorpi monoclonali vor avea secvențe de aminoacizi de imunoglobulină umană și, prin urmare, nu vor provoca răspunsuri la anticorpi umani anti-șoarece (KAMA) atunci când sunt administrați la oameni. Există, de asemenea, metode *in vitro* pentru producerea anticorpilor umani. Acestea includ tehnologia de afișare a fagilor (brevetele americane U.S. Nr. 5.565.332 și 5.573.905) și stimularea *in vitro* a celulelor B umane (brevetele americane U.S. Nr. 5.229.275 și 5.567.610).

Diferitele molecule și fragmente de anticorpi pot proveni din oricare dintre clasele de imunoglobulină cunoscute în mod obișnuit, incluzând dar fără a se limita la IgA, IgA secretoare, IgE, IgG și IgM. Subclasele IgG sunt, de asemenea, bine cunoscute celor din domeniu și includ, dar nu sunt limitate la IgG1, IgG2, IgG3 și IgG4 umane.

Într-o altă realizare, anticorpul conform invenției este un anticorp cu un singur domeniu. Termenul „anticorp cu un singur domeniu” (sdAb) sau „VHH” se referă la domeniul variabil al lanțului greu unic al anticorpilor de tipul care poate fi găsit la mamiferele camelide care sunt în mod natural lipsite de lanțuri ușoare. Astfel de VHH se mai numesc „nanocorpi®”.

În unele exemple de realizare, anticorpul prezentei invenții nu mediază citotoxicitatea mediată de celule dependentă de anticorpi și, prin urmare, nu cuprinde o porțiune Fc care induce citotoxicitatea celulară dependentă de anticorpi (ADCC). În unele exemple de realizare, anticorpul prezentei invenții nu conduce, direct sau indirect, la epuizarea celulelor care exprimă CLEC-1 (de exemplu, nu conduc la o eliminare sau scădere de 10%, 20%, 50%, 60% sau mai mare în numărul de celule care exprimă CLEC-1). În unele exemple de realizare, anticorpul prezentei invenții nu are un domeniu Fc (de exemplu, îi lipsește un domeniu CH2 și / sau CH3), sau cuprinde un domeniu Fc al izotipului IgG2 sau IgG4.

Așa cum este utilizat aici, termenul „citotoxicitate mediată de celule dependentă de anticorpi” sau „ADCC” se referă la o reacție mediată de celule în care celulele citotoxice nespecifice (de exemplu, celulele Natural Killer (NK), neutrofilele și macrofagele) recunosc anticorpul legat pe o celulă țintă și,

ulterior, determină liza celulei țintă. Deși nu doresc să se limiteze la vreun mecanism particular de acțiune, aceste celule citotoxice care mediază ADCC exprimă în general receptori Fc (FcR-uri).

Așa cum este utilizat aici, termenul „epuizare”, în ceea ce privește celulele care exprimă CLEC-1, înseamnă un proces, o metodă sau un compus care poate ucide, elimina, liza sau induce o astfel deucidere, eliminare sau liză încât să afecteze negativ numărul de celule care exprimă CLEC-1 prezente într-o probă sau într-un subiect.

Într-un exemplu de realizare, antagonistul CLEC-1 este un mimetic de anticorp care leagă antigenul.

Așa cum este utilizat aici, termenul „mimetic de anticorp care leagă antigenul ” se referă la proteine artificiale, peptide și orice compuși chimici cu capacitatea de a lega antigeni care imită pe cei ai anticorpilor. Astfel de mimetice cuprind afitine și anticaline, precum și aptameri (aptameri peptidici și aptameri oligonucleotidici). Într-o variantă, antagonistul de CLEC-1 este un aptamer. Aptamerii sunt o clasă de molecule care reprezintă o alternativă la anticorpi în termen de recunoaștere moleculară.

Aptamerii sunt secvențe de oligonucleotide sau oligopeptide cu capacitatea de a recunoaște practic orice clasă de molecule țintă cu afinitate și specificitate ridicate. Astfel de liganzi pot fi izolați prin Evoluția sistematică a liganzilor prin îmbogățire exponențială (SELEX) a unei biblioteci de secvențe aleatorii. Biblioteca de secvențe aleatorii se poate obține prin sinteza chimică combinatorie a ADN-ului. În această bibliotecă, fiecare membru este un oligomer liniar, eventual modificat chimic, al unei secvențe unice. Aptamerii peptidici constau dintr-o regiune variabilă de anticorp constrâns conformațional afișată de o proteină platformă, cum ar fi Tioredoxina A de E. coli, care sunt selectați din biblioteci combinatorii prin două metode hibride.

În unele exemple de realizare, antagonistul de CLEC-1 este o polipeptidă.

Termenul „polipeptidă” înseamnă aici un polimer de aminoacizi care nu are o lungime specifică. Astfel, peptidele, oligopeptidele și proteinele sunt incluse în definiția „polipeptidei”, și acești termeni sunt utilizați în mod interschimbabil în întreaga descriere, precum și în revendicări. Termenul „polipeptidă” nu exclude modificările post-translaționale care includ, dar nu se limitează la fosforilare, acetilare, glicozilare și altele asemenea.

Într-un exemplu de realizare, polipeptida conform invenției are o lungime cuprinsă între 2 și 200 aminoacizi. Într-un exemplu de realizare, polipeptida conform invenției are o lungime cuprinsă între 2 și 190, în special între 10 și 180, între 10 și 170, între 10 și 160, între 10 și 150, între 10 și 140, între 10 și 130, între 10 și 120, între 10 și 110 aminoacizi. Într-un exemplu de realizare, polipeptida conform invenției are o lungime cuprinsă între 10 și 100 aminoacizi. Într-un exemplu de realizare, polipeptida conform invenției are o lungime cuprinsă între 50 și 100 de aminoacizi. Într-un exemplu de realizare, polipeptida conform invenției are o lungime 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 sau 100 aminoacizi.

Într-o concretizare particulară, polipeptida este un echivalent funcțional de CLEC-1. Așa cum este utilizat aici, un „echivalent funcțional” de CLEC-1 este un compus care este capabil să se lege la cel puțin un ligand de CLEC-1, împiedicând astfel interacțiunea sa cu CLEC-1. Termenul „echivalent funcțional” include fragmente, mutații și muteine ale CLEC-1. Termenul „echivalent funcțional” include astfel orice echivalent de CLEC-1 obținut prin modificarea secvenței de aminoacizi, de exemplu prin una sau mai multe deleții de aminoacizi, substituții sau adăugări astfel încât analogul proteinei să păstreze capacitatea de a se lega de ligandul său. Substituțiile de aminoacizi pot fi făcute, de exemplu, prin mutația punctuală a ADN-ului care codifică secvența de aminoacizi. Echivalenții funcționali includ, dar nu sunt limitați la molecule care se leagă la un ligand al CLEC-1 și cuprind toate sau o porțiune a domeniilor extracelulare ale CLEC-1 astfel încât să formeze un receptor solubil care este capabil să capteze ligandul de CLEC-1. Astfel, echivalenții funcționali includ forme solubile de CLEC-1. O formă solubilă adecvată a acestor proteine sau echivalenți funcționali ai acestora ar putea cuprinde, de exemplu, o formă trunchiată a proteinei din care a fost îndepărtat domeniul transmembranar prin metode chimice, proteolitice sau recombinante. În special, echivalentul funcțional constând dintr-o secvență având cel puțin 80% identitate, mai ales cel puțin 85%, cel puțin 86%, cel puțin 87%, cel puțin 88%, cel puțin 89%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% și chiar mai ales, cel puțin 99% identitate cu proteina corespunzătoare pe întreaga lungime a proteinei corespunzătoare. Așa cum este utilizat aici, termenul „proteină corespunzătoare” se referă la proteina pentru care echivalentul funcțional al invenției are o funcție similară. Procentele de identitate la care se face referire în prezentarea invenției sunt determinate pe baza unei alinieri globale a secvențelor care urmează să fie comparate, adică pe o aliniere a secvențelor pe întreaga lor lungime, utilizând de exemplu algoritmul lui Needleman și Wunsch 1970. Această comparație a secvenței se poate face, de exemplu, utilizând software-ul needle utilizând parametrul decalaj deschis "Gap open" egal cu 10,0, parametrul decalaj extins "Gap Extend" egal cu 0,5 și o matrice "BLOSUM 62". Software-ul needle este disponibil pe site-ul ebi.ac.uk la nivel mondial, sub denumirea

„needle”. Termenul „un fragment echivalent funcțional” așa cum este utilizat aici poate însemna, de asemenea, orice fragment sau ansamblu de fragmente de CLEC-1 care se leagă de un ligand de CLEC-1. În consecință, prezenta invenție furnizează o polipeptidă, în special un echivalent funcțional, capabil să inhibe legarea de CLEC-1 la cel puțin un ligand al CLEC-1, polipeptidă care cuprinde aminoacizi consecutivi având o secvență care corespunde secvenței din cel puțin o porțiune a unui domeniu extracelular al CLEC-1, porțiune care se leagă de un ligand al CLEC-1. În unele exemple de realizare, polipeptida, în special echivalentul funcțional, corespunde unui domeniu extracelular al CLEC-1.

În unele exemple de realizare, echivalentul funcțional al CLEC-1 este fuzionat cu o polipeptidă heterologă pentru a forma o proteină de fuziune. Așa cum este utilizat aici, o „proteină de fuziune” cuprinde total sau parțial (activ biologic, în mod tipic) dintr-un echivalent funcțional al prezentei invenții legat în mod operațional de o polipeptidă heterologă (adică o altă polipeptidă decât aceeași polipeptidă). În cadrul proteinei de fuziune, termenul „legat operabil” este destinat să indice că echivalentul funcțional al prezentei invenții și polipeptida heterologă sunt fuzionate reciproc în cadru. Polipeptida heterologă poate fi fuzionată la capătul N-terminal sau C-terminal al echivalentului funcțional al prezentei invenții.

În unele exemple de realizare, echivalentul funcțional al CLEC-1 este fuzionat la un domeniu constant de imunoglobulină (regiunea Fc) pentru a forma o imunoadezină. Imunoadezinele pot deține multe dintre proprietățile chimice și biologice valoroase ale anticorpilor umani. Deoarece imunoadezinele pot fi construite dintr-o secvență de proteine umane cu o specificitate dorită legată de o balama de imunoglobulină umană adecvată și o secvență de domeniu constant (Fc), specificitatea de legare de interes poate fi realizată utilizând componente în întregime umane. Astfel de imunoadezine sunt minim imunogene pentru pacient și sunt sigure pentru utilizare cronică sau repetată. În unele exemple de realizare, regiunea Fc este o regiune Fc de secvență nativă. În unele exemple de realizare, regiunea Fc este o variantă a regiunii Fc. Într-un alt exemplu de realizare, regiunea Fc este o regiune Fc funcțională. Așa cum este utilizat aici, termenul „regiune Fc” este utilizat pentru a defini o regiune C-terminală a unui lanț greu de imunoglobulină, incluzând regiuni Fc de secvență nativă și regiuni Fc variante. Deși limitele regiunii Fc ale unui lanț greu de imunoglobulină ar putea varia, regiunea Fc a lanțului greu IgG uman este de obicei definită pentru a se întinde de la un reziduu de aminoacizi în poziția Cys226, sau de la Pro230, până la capătul carboxil al acestuia. Porțiunea de aderență și porțiunea de secvență de imunoglobulină a imunoadezinei pot fi legate printr-un linker minim. Secvența de imunoglobulină este de obicei, dar nu neapărat, un domeniu constant de imunoglobulină. Porțiunea de imunoglobulină din himerale prezentei invenții poate fi obținută din subtipurile IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4, IgA, IgE, IgD sau IgM, dar în mod tipic IgG1 sau IgG4. În unele exemple de realizare, echivalentul funcțional al CLEC-1 și porțiunea de secvență de imunoglobulină a imunoadezinei sunt legate de un linker minim. Așa cum este utilizat aici, termenul „linker” se referă la o secvență de cel puțin un aminoacid care leagă polipeptida conform invenției și porțiunea de secvență de imunoglobulină. Un astfel de linker poate fi util pentru a preveni obstacolele sterice. În unele variante, linkerul are 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 de reziduuri de aminoacizi. Cu toate acestea, limita superioară nu este critică, ci este aleasă din motive de comoditate, de exemplu, cu privire la producerea biofarmaceutică a unor astfel de polipeptide. Secvența linker poate fi o secvență naturală sau o secvență non-naturală. Dacă este utilizat în scopuri terapeutice, linkerul este de obicei neimunogen la subiectul cărui i se administrează imunoadezina. Un grup util de secvențe linker sunt linkeri derivați din regiunea balama a anticorpilor cu lanț greu, așa cum este descris în publicațiile WO 96/34103 și WO 94/04678. Alte exemple sunt secvențele linker poli-alanină.

Polipeptidele conform invenției pot fi produse prin orice mijloace adecvate, așa cum va fi evident pentru specialiștii în domeniu. Pentru a produce cantități suficiente de polipeptide spre utilizare în conformitate cu prezenta invenție, exprimarea poate fi realizată convenabil prin cultivarea în condiții adecvate a celulelor gazdă recombinante care conțin polipeptida conform invenției. În special, polipeptida este produsă prin mijloace recombinante, prin exprimare dintr-o moleculă de acid nucleic de codificare. Sunt bine cunoscute sistemele pentru clonarea și exprimarea unei polipeptide într-o varietate de celule gazdă diferite. Când este exprimată sub formă recombinantă, polipeptida este generată în special prin expresia dintr-un acid nucleic codificator într-o celulă gazdă. Poate fi utilizată orice celulă gazdă, în funcție de cerințele individuale ale unui anumit sistem. Celulele gazdă adecvate includ celule bacteriene de mamifere, celule vegetale, drojdie și sisteme de baculovirus. Liniile celulare de mamifere disponibile în domeniu pentru exprimarea unei polipeptide heterologe includ celule ovariene de hamster chinezesc, celule HeLa, celule renale ale hamsterilor pui și multe altele. Bacteriile sunt, de asemenea, gazde preferate pentru producerea de proteine recombinante, datorită ușurinței cu care bacteriile pot fi manipulate și crescute. O gazdă bacteriană preferată comună este E coli.

Polipeptidele invenției, fragmente ale acestora și proteinele de fuziune conform invenției pot prezenta modificări post-tranlaționale, incluzând, dar nelimitându-se la glicozilări (de exemplu, glicozilări N-legate sau O-legate), miristilări, palmitări, acetilări și fosforilări (de exemplu, serină / treonină sau tirozină).

În unele exemple de realizare, se are în vedere faptul că polipeptidele utilizate în metodele terapeutice ale prezentei invenții pot fi modificate pentru a îmbunătăți eficacitatea lor terapeutică. O astfel de modificare a compușilor terapeutici poate fi utilizată pentru a reduce toxicitatea, pentru a crește timpul circulator sau pentru a modifica biodistribuirea. De exemplu, toxicitatea compușilor terapeutici potențial importanți poate fi scăzută semnificativ prin combinarea cu o varietate de vehicule purtătoare de medicamente care modifică biodistribuirea.

Un alt aspect al prezentei invenții se referă la o metodă de tratare a cancerului, în special prin promovarea răspunsului celulelor T, la un subiect care are nevoie de acesta, cuprinzând administrarea la subiect a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un antagonist al CLEC-1.

Prezența invenției se referă astfel la un antagonist al CLEC-1 pentru utilizare în tratamentul cancerului, în special prin promovarea răspunsului celulelor T.

Prezența invenției se referă astfel la utilizarea unui antagonist al CLEC-1 la fabricarea unui medicament pentru tratamentul cancerului, în special prin promovarea răspunsului celulelor T.

În unele exemple de realizare, antagonistul CLEC-1 al invenției este administrat subiectului în cantitate eficientă terapeutic.

Termenii „a administra” sau „administrare” se referă la actul de injectare sau livrare fizică în alt mod a unei substanțe așa cum există în afara corpului (de exemplu, antagonistul CLEC-1 al prezentei invenții) în subiect, cum ar fi prin eliberare în mucoasă, intradermică, intravenoasă, subcutanată, intramusculară, intraarticulară și / sau orice altă metodă de eliberare fizică descrisă aici sau cunoscută în domeniu. Când se tratează o boală sau un simptom al acesteia, administrarea substanței are loc de obicei după debutul bolii sau simptomelor acesteia. Când se previne o boală sau simptome ale acesteia, administrarea substanței are loc de obicei înainte de apariția bolii sau a simptomelor acesteia.

Prin „cantitate eficientă terapeutic” se înțelege o cantitate suficientă de antagonist CLEC-1 pentru utilizare într-o metodă pentru tratamentul cancerului la un raport rezonabil beneficiu / risc aplicabil oricărui tratament medical. Se va înțelege că utilizarea zilnică totală a compușilor și compozițiilor prezentei invenții va fi decisă de către medicul curant în cadrul unei judecăți medicale solide. Nivelul de doză eficient terapeutic specific pentru un anumit subiect va depinde de o varietate de factori, inclusiv de severitatea cancerului, de vârsta, greutatea corporală, starea generală de sănătate, sexul și dieta subiectului; de timpul de administrare, calea de administrare și rata de excreție a compusului specific utilizat; de durata tratamentului; și de factori similari bine cunoscuți în domeniile medicale. De exemplu, este bine cunoscut în cadrul abilității din domeniu, să se înceapă dozele de compus la niveluri mai mici decât cele necesare pentru a obține efectul terapeutic dorit, și să se mărească treptat doza până se obține efectul dorit. Cu toate acestea, doza zilnică a produselor poate fi variată pe o gamă largă de la 0,01 la 1000 mg per adult pe zi. De obicei, compozițiile conțin 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 și 500 mg de ingredient activ pentru ajustarea simptomatică a dozei la subiectul care urmează a fi tratat. Un medicament conține de obicei de la aproximativ 0,01 mg la aproximativ 500 mg de ingredient activ, în mod tipic de la 1 mg la aproximativ 100 mg de ingredient activ. O cantitate eficientă de medicament este furnizată de obicei la un nivel de dozare de la 0,0002 mg / kg la aproximativ 20 mg / kg de greutate corporală pe zi, în special de la aproximativ 0,001 mg / kg până la 7 mg / kg de greutate corporală pe zi.

Compozițiile conform invenției sunt formulate pentru administrare parenterală, transdermică, orală, rectală, subcutanată, sublinguală, topică sau intranasală.

Formele adecvate de administrare a unității cuprind forme pe cale orală, cum ar fi tablete, capsule de gel, pulberi, granule și suspensii orale sau soluții, forme de administrare sublinguală și bucală, ca aerosoli, implanturi, forme de administrare subcutanată, transdermică, topică, intraperitoneală, intramusculară, intravenoasă, subdermică, transdermică, intratecală și intranasală, și forme de administrare rectală.

Într-un exemplu de realizare, compozițiile, în special compozițiile farmaceutice, conform invenției sunt formulate pentru administrare parenterală. Compozițiile farmaceutice conțin vehicule care sunt acceptabile farmaceutic pentru o formulare care poate fi injectată. Acestea pot fi în special soluții izotone, sterile, saline (fosfat monosodic sau disodic, sodiu, potasiu, calciu sau clorură de magneziu și altele asemenea, sau amestecuri ale acestor săruri), sau uscate, în special compoziții liofilizate, care, în funcție de caz, permit constituirea de soluții injectabile la adăugarea de apă sterilizată sau ser fiziologic.

Într-un exemplu preferat de realizare, compozițiile conform invenției sunt formulate pentru administrare intravenoasă. Într-o altă realizare, compozițiile conform invenției sunt formulate pentru administrare orală.

De obicei, ingredientul activ al prezentei invenții (adică antagonistul de CLEC-1) este combinat cu excipienți acceptabili farmaceutic și, opțional, matrici cu eliberare susținută cum ar fi polimeri biodegradabili, pentru a forma compoziții farmaceutice.

Termenul „farmaceutic” sau „acceptabil farmaceutic” se referă la entități și compoziții moleculare care nu produc o reacție adversă, alergică sau de altă natură nefavorabilă atunci când se administrează unui mamifer, în special unui om, după caz.

Un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic se referă la un agent de umplere solid, semi-solid sau lichid netoxic, un diluant, material de încapsulare sau o formulare auxiliară de orice tip. Purtătorul poate fi, de asemenea, un solvent sau un mediu de dispersie care conține, de exemplu, apă, etanol, polioli (de exemplu, glicerol, propilen glicol și polietilen glicol lichid și altele asemenea), amestecuri adecvate ale acestora și uleiuri vegetale. Fluiditatea adecvată poate fi menținută, de exemplu, prin utilizarea unui strat de acoperire, cum ar fi lecitina, prin menținerea dimensiunii necesare a particulelor în cazul dispersiei și prin utilizarea agenților tensioactivi. Prevenirea acțiunii microorganismelor poate fi determinată de diferiți agenți antibacterieni și antifungici, de exemplu, parabenii, clorobutanol, fenol, acid sorbic, timerosal și altele asemenea. În multe cazuri, va fi de preferat să se includă agenți izotonici, de exemplu, zaharuri sau clorură de sodiu. Absorbția prelungită a compozițiilor injectabile poate fi realizată prin utilizarea în compoziții a agenților care întârzie absorbția, de exemplu, monostearat de aluminiu și gelatină.

În unele exemple de realizare, antagonistul CLEC-1 al prezentei invenții este administrat subiectului în combinație cu un al doilea ingredient activ.

Al doilea ingredient activ menționat include, dar nu se limitează la probiotice și agenți terapeutici, așa cum este descris mai jos.

Prezenta invenție se referă astfel la combinația unui antagonist al CLEC-1 cu un al doilea ingredient activ pentru utilizare în tratamentul cancerului.

În unele exemple de realizare, antagonistul de CLEC-1 al prezentei invenții este administrat subiectului în combinație cu un tratament standard (convențional). Prezenta invenție se referă astfel la combinația unui antagonist de CLEC-1 cu un tratament convențional pentru utilizare în tratamentul cancerului.

Așa cum este utilizat aici, termenul „tratament standard sau convențional” se referă la orice tratament al cancerului (medicament, radioterapie etc.) administrat de obicei unui subiect care suferă de cancer.

În unele exemple de realizare, antagonistul de CLEC-1 al prezentei invenții este administrat subiectului în combinație cu cel puțin un alt agent terapeutic, de exemplu pentru tratarea cancerelor. O astfel de administrare poate fi simultană, separată sau secvențială. Pentru administrare simultană, agenții pot fi administrați ca o compoziție sau compoziții separate, după caz. Agentul terapeutic suplimentar este de obicei relevant pentru afecțiunea care trebuie tratată. Exemple de agenți terapeutici includ alți anticorpi anti-cancer, agenți citotoxici, agenți chimioterapeutici, agenți anti-angiogenici, imunogeni anti-cancer, agenți de control al ciclului celular / reglare a apoptozei, agenți de reglare hormonală și alți agenți descriși mai jos.

În unele exemple de realizare, antagonistul de CLEC-1 al prezentei invenții este utilizat în combinație cu un agent chimioterapeutic, o terapie împotriva cancerului țintită, un agent imunoterapeutic, sau radioterapie.

În unele exemple de realizare, antagonistul de CLEC-1 al prezentei invenții este utilizat în combinație cu un agent chimioterapeutic. Prezenta invenție se referă astfel la combinația unui antagonist de CLEC-1 cu un agent chimioterapeutic pentru utilizare în tratamentul cancerului.

Termenul „agent chimioterapeutic” se referă la compuși chimici care sunt eficienți în inhibarea creșterii tumorii. Exemple de agenți chimioterapeutici includ agenți alchilanți, cum ar fi tiotepa și ciclofosfamida; alchil sulfonati precum busulfan, improsulfan și piposulfan; aziridine cum ar fi benzodopa, carboquona, meturedopa și uredopa; etilenimine și metilamelamine incluzând altretamină, trietilenmelamină, trietilenfosforamidă, trietilentiofosforarnidă și trimetilolomelamină; acetogenine (în special bullatacin și bullatacinonă); o camptotecină (inclusiv analogul sintetic topotecan); briostatina; calstatin; CC-1065 (inclusiv analogii săi sintetici adozelesin, carzelesin și bizelesin); criptoficine (în special criptoficina 1 și criptoficina 8); dolastatină; duocarmicină (inclusiv analogii sintetici, KW-2189 și CBI-TMI); eleuterobină; pancratistatină; o sarcodictină; spongistatină; muștar de azot, cum ar fi clorambucil, clornafazină, colofosfamidă, estramustină, ifosfamidă, mecloretamină, clorhidrat de oxid de mecloretamină, melfalan, novembicină, fenesterină, prednimustină, trofosfamidă, muștar uracil; nitrozuree precum carmustină, clorozotocină, fotemustină, lomustină, nimustină, ranimustină; antibiotice cum ar fi antibioticele de tip enediină (de exemplu calicheamicină, în special calicheamicină (11 și calicheamicină 211, vezi, de exemplu, Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33: 183-186 (1994); dinemicină, inclusiv dinemicină A; o esperamicină; precum și cromofor neocarzinostatină și cromofori de antibiotice enediyne cromoproteice), aclacinomizine, actinomycină, autramicină, azaserină, bleomicine, cactinomycină, carabicină, canninomycină, carzinofilină, cromomicine, dactinomycină, daunorubicină, detorubicină, 6-diazo-5-oxo-L-norleucină (incluzând morfolino-doxorubicină, cianomorfolino-doxorubicină, 2-pirolino-doxorubicină și deoxidoxorubicină), epirubicină, esorubicină, idanrbicină,

marcellomicină, mitomicine, acid micofenolic, nogalarnicină, olivomicine, peplomicină, potfiromicină, puromicină, quelamicină, rodozubicină, streptomgrină, streptozocină, tubercidină, ubenimex, zinostatină, zorubicină; anti-metaboliți precum metotrexat și 5-fluorouracil (5-FU); analogi de acid folic precum denopterin, metotrexat, pteropterin, trimetrexat; analogi de purină precum fludarabină, 6-mercaptopurină, tiamiprină, tioguanină; analogi de pirimidină precum ancitabină, azacitidină, 6-azauridină, carmofur, citarabină, dideoxiuridină, doxifluridină, encitabină, floxuridină, 5-FU; androgeni precum calusteronă, propionat de dromostanonă, epitiostanol, mepitiostan, testolactonă; anti-suprarenale precum aminoglutetimidă, mitotan, trilostan; agent de completare a acidului folic precum acid froinic; aceglatonă; aldofosfamid glicozidă; acid aminolevulinic; amsacrină; bestrabucil; bisantren; edatraxat; defofamină; demecolcină; diaziqonă; elfornitină; acetat de eliptiniu; o epotilonă; etogluclid; nitrat de galiu; hidroxiuree; lentinan; lonidamină; maytansinoide precum maytansină și ansamitocine; mitoguzonă; mitoxantronă; mopidamol; nitracrină; pentostatină; fenamet; pirarubicină; acid podofillinic; 2-etilhidrazidă; procarbazină; PSK®; razoxan; rizoxin; sizofiran; spirogennaniu; acid tenuazonic; triaziqonă; 2,2',2''-trichlorotrietilarnină; tricotecene (în special toxina T-2, verracurin A, roridin A și anguidină); uretan; vindesină; dacarbazină; mannomustină; mitobromtol; mitolactol; pipobroman; gacitosină; arabinosidă ("Ara-C"); ciclofosfamidă; tiotepa; taxoide, de exemplu paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) și doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucil; gemcitabină; 6-tioguanină; mercaptopurină; metotrexat; analogi de platină precum cisplatină și carboplatină; vinblastină; platină; etoposid (VP-16); ifosfamidă; mitomicin C; mitoxantronă; vincristină; vinorelbină; navelbină; novantronă; teniposid; daunomicină; aminopterin; xeloda; ibandronat; CPT-1 I; inhibitor de topoizomerază RFS 2000; difluorometilornitină (DMFO); acid retinoic; capecitabină; și sărurile acceptabile farmaceutic, acizii sau derivații ai oricăruia dintre cele de mai sus. De asemenea, sunt incluși în această definiție agenții antihormonali care acționează pentru reglarea sau inhibarea acțiunea hormonilor asupra tumorilor precum anti-estrogeni incluzând de exemplu tamoxifen, raloxifen, 4(5)-imidazoli de inhibare a aromatazei, 4-hidroxitamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY117018, onapristonă, și toremifen (Fareston); și anti-androgeni precum flutamidă, nilutamidă, bicalutamidă, leuprolidă, și goserelină; și săruri, acizi sau derivați acceptabili farmaceutic ai oricăruia dintre cei de mai sus.

În unele exemple de realizare, antagonistul de CLEC-1 al prezentei invenții este utilizat în combinație cu o terapie țintită pentru cancer. Prezenta invenție se referă astfel la combinația unui antagonist de CLEC-1 cu o terapie țintită pentru utilizare în tratamentul cancerului.

Terapiile orientate împotriva cancerului sunt medicamente sau alte substanțe care blochează creșterea și răspândirea cancerului prin interferența cu molecule specifice („ținte moleculare”) care sunt implicate în creșterea, progresia și răspândirea cancerului. Terapiile orientate împotriva cancerului sunt uneori numite „medicamente țintite molecular”, „terapii țintite molecular”, „medicamente de precizie” sau denumiri similare. În unele variante, terapia vizată constă în administrarea subiectului cu un inhibitor al tirozin kinazei. Termenul „inhibitor al tirozin kinazei” se referă la oricare dintre o varietate de agenți terapeutici sau medicamente care acționează ca inhibitori selectivi sau neselectivi ai receptorilor și / sau non-receptorilor tirozin kinaze. Inhibitorii tirozin kinazei și compușii înrudiți sunt bine cunoscuți în domeniu și descriși în publicația de brevet american U.S 2007/0254295. Un specialist în domeniu va aprecia că un compus înrudit cu un inhibitor al tirozin kinazei va recapitula efectul inhibitorului tirozin kinazei, de exemplu, compusul înrudit va acționa asupra unui membru diferit al căii de semnalizare a tirozin kinazei pentru a produce același efect ca și un inhibitor al tirozin kinazei al respectivei tirozin kinaze. Exemple de inhibitori ai tirozin kinazei și compușii înrudiți corespunzători pentru utilizare în metodele de realizare a prezentei invenții includ, dar nu sunt limitate la, 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); STI, leflunomidă (SU101), vandetanib (Zactima; ZD6474), MK-2206 derivați ai clorhidratului de (8-[4-aminociclobutil]fenil]-9-fenil-1,2,4-triazolo[3,4-f][1,6]naftiridin-3(2H)-onă), analogi ai acestora și combinații ale acestora. Inhibitori suplimentari de tirozin kinază și compușii înrudiți corespunzători pentru utilizare în prezenta invenție sunt descriși, de exemplu, în publicația de brevet american U.S 2007/0254295, brevetele americane U.S. Nr.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, și 6.958.340. În unele exemple de realizare, inhibitorul tirozin kinazei este un inhibitor de kinază cu moleculă mică care a fost administrat oral și care a făcut obiectul a cel puțin unui studiu clinic de fază I, mai preferabil cel puțin unui studiu clinic de fază II, chiar mai preferabil, cel puțin unui studiu clinic de fază III și, cel mai preferabil, aprobat de FDA pentru cel puțin o indicație hematologică sau oncologică. Exemple de astfel de inhibitori includ, dar nu se limitează la, 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, Midostaurin, Enzastaurin, AEE-788, Pazopanib, Axitinib, Motasenib, OSI-930, Cediranib, KRN-951, Dovitinid, 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, și PD-0325901.

5 În unele exemple de realizare, antagonistul de CLEC-1 al prezentei invenții este utilizat în combinație cu un agent imunoterapeutic. Prezenta invenție se referă astfel la combinația unui antagonist al CLEC-1 cu un agent imunoterapeutic pentru utilizare în tratamentul cancerului.

Termenul „agent imunoterapeutic”, așa cum este utilizat aici, se referă la un compus, o compoziție sau un tratament care, indirect sau direct, îmbunătățește, stimulează sau crește răspunsul imun al organismului împotriva celulelor canceroase și / sau care scade efectele secundare ale altor terapii anticanceroase. Imunoterapia este astfel o terapie care stimulează sau îmbunătățește direct sau indirect răspunsurile sistemului imunitar la celulele canceroase, și / sau diminuează efectele secundare care ar fi putut fi cauzate de alți agenți anti-cancer. De asemenea, imunoterapia este menționată în domeniu ca terapie imunologică, terapie biologică, terapie modificatoare a răspunsului biologic și bioterapie. Exemple de agenți imunoterapeutici comuni cunoscuți în domeniu includ, dar nu se limitează la, citokine, vaccinuri împotriva cancerului, anticorpi monoclonali și adjuvanți non-citokinici. Alternativ, tratamentul imunoterapeutic poate consta în administrarea către subiect a unei cantități de celule imune (celule T, celule NK, celule dendritice, celule B ...). Agenții imunoterapeutici pot fi nespecifici, adică stimulează sistemul imunitar în general, astfel încât corpul uman să devină mai eficient în combaterea creșterii și / sau răspândirii celulelor canceroase, sau pot fi specifici, adică direcționați către celulele canceroase în sine pot combina utilizarea agenților imunoterapeutici nespecifici și specifici. Agenții imunoterapeutici nespecifici sunt substanțe care stimulează sau îmbunătățesc indirect sistemul imunitar. Agenții imunoterapeutici nespecifici au fost folosiți singuri ca terapie principală pentru tratamentul cancerului, precum și în plus față de o terapie principală, caz în care agentul imunoterapeutic nespecific funcționează ca adjuvant pentru a spori eficacitatea altor terapii (de exemplu vaccinuri împotriva cancerului). Agenții imunoterapeutici nespecifici pot funcționa și în acest ultim context pentru a reduce efectele secundare ale altor terapii, de exemplu, supresia măduvei osoase indusă de anumiți agenți chimioterapeutici. Agenții imunoterapeutici nespecifici pot acționa asupra celulelor cheie ale sistemului imunitar și pot provoca răspunsuri secundare, cum ar fi producția crescută de citokine și imunoglobuline. Alternativ, agenții pot cuprinde ei înșiși citokine. Agenții imunoterapeutici nespecifici sunt clasificați în general ca citokine sau adjuvanți non-citokinici. O serie de citokine s-au găsit aplicabile în tratamentul cancerului fie ca imunoterapii generale nespecifice, menite să stimuleze sistemul imunitar, fie ca adjuvanți furnizați cu alte terapii. Citokinele adecvate includ, dar nu se limitează la, interferoni, interleukine și factori de stimulare a coloniilor. Interferonii (IFN) luați în considerare prin prezenta invenție includ tipurile comune de IFN, IFN-alfa (IFN- α), IFN-beta (IFN- β) și IFN-gamma (IFN- γ). IFN-urile pot acționa direct asupra celulelor canceroase, de exemplu, încetinind creșterea lor, promovând dezvoltarea lor în celule cu un comportament mai normal și / sau crescând producția lor de antigeni, facilitând astfel recunoașterea și distrugerea celulelor canceroase. IFN-urile pot acționa indirect, de asemenea, asupra celulelor canceroase, de exemplu, încetinind angiogeneza, stimulând sistemul imunitar și / sau stimulând celulele natural killer (NK), celulele T și macrofagele. IFN-alfa recombinant este disponibil comercial sub formă de Roferon (Roche Pharmaceuticals) și Intron A (Schering Corporation). Interleukinele avute în vedere prin prezenta invenție includ IL-2, IL-4, IL-11 și IL-12. Exemple de interleukine recombinante disponibile comercial includ Proleukin® (IL-2; Chiron Corporation) și Neumega® (IL-12; Wyeth Pharmaceuticals). Zymogenetics, Inc. (Seattle, Washington) testează în prezent o formă recombinantă de IL-21, care este prevăzută, de asemenea, pentru utilizare în combinațiile prezentei invenții. Factorii de stimulare a coloniei (CFS) luați în considerare prin prezenta invenție includ factorul de stimulare a coloniei de granulocite (G-CSF sau filgrastim), factorul de stimulare a coloniilor de granulocite-macrofage (GM-CSF sau sargramostim) și eritropoietina (epoetina alfa, darbepoietina). Tratamentul cu unul sau mai mulți factori de creștere poate ajuta la stimularea generării de noi celule sanguine la subiecții supuși chimioterapiei tradiționale. În consecință, tratamentul cu CSF poate fi util în scăderea efectelor secundare asociate chimioterapiei și poate permite utilizarea unor doze mai mari de agenți chimioterapeutici. Diverși factori de stimulare a coloniei recombinante sunt disponibili comercial, de exemplu, Neupogen® (G-CSF; Amgen), Neulasta (pelfilgrastim; Amgen), Leukine (GM-CSF; Berlex), Procrit (eritropoietină; Ortho Biotech), Epogen (eritropoietină; Amgen), Arnesp (eritropoietină). Compozițiile combinate și metodele de administrare a combinației conform prezentei invenții pot implica, de asemenea, metode de imunoterapie „cu celule întregi” și „adoptive”. De exemplu, astfel de metode pot cuprinde infuzie sau re-infuzie de celule ale sistemului imunitar (de exemplu, limfocite care se infiltrează în tumori (TIL-uri), cum ar fi celule T CC2+ și / sau CD8+ (de exemplu, celule T extinse cu antigene specifice tumorii și / sau îmbunătățiri genetice), celule B care exprimă anticorpi sau alte celule care produc sau prezintă anticorpi, celule dendritice (de exemplu, celule dendritice cultivate cu un agent de expansiune DC, cum ar fi GM-CSF și / sau Flt3-L, și / sau celule dendritice încărcate cu antigen, asociate cu tumoarea), celule NK

antitumorale, așa-numitele celule hibride sau combinații ale acestora. Lizatele celulare pot fi utile, de asemenea, în astfel de metode și compoziții. „Vaccinurile” celulare în studiile clinice care pot fi utile în astfel de aspecte includ Canvaxin™, APC-8015 (Dendreon), HSPPC-96 (Antigenics) și lizatele de celule Melacine®. Antigenii eliberați din celulele canceroase și amestecurile acestora (a se vedea, de exemplu Bystryn și colab., *Clinical Cancer Research* Vol. 7, 1882-1887, iulie 2001), amestecați opțional cu adjuvanți precum alum, pot fi, de asemenea, componente în astfel de metode și compoziții combinate.

În unele exemple de realizare, antagonistul de CLEC-1 al prezentei invenții este utilizat în combinație cu radioterapia. Prezenta invenție se referă astfel la combinația unui antagonist al CLEC-1 cu radioterapie, pentru utilizare în tratamentul cancerului.

Radioterapia poate cuprinde radiații sau administrarea asociată de radiofarmaceutice la un pacient. Sursa de radiații poate fi externă sau internă pentru pacientul tratat (tratamentul cu radiații poate fi, de exemplu, sub formă de radioterapie cu fascicul extern (EBRT) sau brahiterapie (BT)). Elementele radioactive care pot fi utilizate în practicarea unor astfel de metode includ, de exemplu, raniu, cesiu-137, iridiu-192, americium-241, aur-198, cobalt-57, cupru-67, tehneci-99, iodură-123, iodură-131, și indiu-III.

Într-un exemplu de realizare, prezenta dezvoltare se referă la o metodă de screening a unui antagonist de CLEC-1 care cuprinde etapele constând din:

- a) furnizare a unei pluralități de celule care exprimă CLEC-1 pe suprafața lor;
- b) incubare a respectivelor celule cu un compus candidat;
- c) determinare dacă respectivul compus candidat se leagă și blochează, suprimă sau reduce activitatea biologică a lui CLEC-1, și dacă respectivul candidat menționat promovează răspunsul celulelor T;
- și d) selectare a compusului candidat care se leagă și blochează, suprimă sau reduce activitatea biologică a lui CLEC-1, și promovează răspunsul celulelor T.

Într-un exemplu particular de realizare, metoda de screening a invenției poate cuprinde în plus o etapă constând în administrarea compusului candidat selectat în etapa d) la un model animal, pentru a valida efectele protectoare și / sau terapeutice ale candidatului menționat.

În general, astfel de metode de screening implică furnizarea de celule adecvate care exprimă CLEC-1 pe suprafața lor. În special, un acid nucleic care codifică CLEC-1 poate fi utilizat pentru a transfecta celulele, cu scopul de a exprima astfel receptorul invenției. O astfel de transfecție poate fi realizată prin metode bine cunoscute în domeniu.

Prezenta dezvoltare se referă, de asemenea, la o metodă de preparare a unui compus utilizat pentru tratarea cancerului, respectiva metodă cuprinzând o etapă de identificare a antagonistului de CLEC-1 capabil să promoveze răspunsul celulelor T.

Invenția va fi ilustrată în continuare prin următoarele figuri și exemple.

FIGURI:

Figura 1: Exprimarea și reglarea de ARNm și proteine CLEC-1 în organele și celulele umane.

A) Expresia ARNm de CLEC-1 a fost evaluată prin RT-PCR cantitativă în leucocite din sânge periferic (PBL), neutrofile (neutro), monocite (mono), celule dendritice derivate din monocite (moDC), celule endoteliale aortice umane (HAEC), celule T și B.

B) Diagramele reprezentative în puncte și histogramme de izotip IgG1 sau colorare CLEC-1 evaluate prin citometrie în flux pe sângele uman i) CD45+ CD14- CD11c+ HLA-DR^{ridicat} DC, ii) monocite CD45+ CD14+ iii), neutrofile SSC^{ridicat} CD16+ ,și în iii) HAEC (extracelulare și intracelulare), cu mAb anti-hCLEC-1. Grafic histogramă cu imaginea suprapusă a CLEC-1 care se potrivește cu graficul histogrammei celulelor colorate cu izotipul de control IgG1.

C) Expresia CLEC-1 pe moDC-uri umane. i) Diagrame reprezentative ale % din moDC care exprimă pe suprafața celulei CLEC-1 (APC) și HLA-DR (FITC) evaluate prin citometrie în flux în celule nestimulate (SUA) și celule stimulate cu LPS (TLR4-L), Poly I: C (TLR3-L), R848 (TLR7-L) și TGF-β așa cum este descris în Materiale și metode, cu mAb anti-hCLEC-1. Izotipul IgG1 a fost utilizat ca martor. ii) Histograma reprezintă intensitatea medie a fluorescenței (MFI) ± SEM a colorării CLEC-1 în 6 experimente independente. Analiza statistică a colorării CLEC-1 MFI a fost efectuată între celulele US și celulele stimulate.

Figura 2: Efectul mecanismului de declanșare CLEC-1 asupra maturării moDC umane și activării celulelor T în aval.

A) MoDC uman incubat cu nimic sau cu control al izotipului anti-CLEC-1 sau IgG1 legat de plăci au fost alternativ stimulate simultan cu LPS (1μg / ml) timp de 24 de ore, recoltate, și au fost evaluate CD80, CD86, CD83 și HLA-DR prin citometrie în flux și B), TNF-a, IL-12p70, IL-6, IL-23 și IL-10 au fost evaluate în supernatante prin ELISA.

C) Apoi, celulele au fost spălate și supuse la MLR cu celule T alogene timp de 5 zile. Proliferarea a fost evaluată prin citometrie în flux prin diluție CFSE în celule T alogene, și IL-17 și IFN-γ au fost evaluate în supernatant prin ELISA.

Figura 3: Efectul deficitului de CLEC-1 (șobolani KO CLEC-1) asupra maturării BMDC la șobolan, secreția de citokine și proprietățile de activare de celule T. BMDC au fost generate de la șobolani WT sau KO timp de 8 zile așa cum este descris în Materiale și metode, și incubate timp de 4 zile în MLR cu celule T CD4⁺ alogene purificate de la șobolani naivi. i) Histograma și colorarea reprezentativă a proliferării evaluate în celulele T CD4⁺ prin diluarea CFSE prin citometrie în flux, și ii) Histograma și grafice în puncte reprezentative ale procentului de celule IL-17⁺ și IFN- γ ⁺ printre celulele T CD4⁺ închise, evaluate prin citometrie în flux. Datele au fost exprimate în histograme ca medie \pm SEM din 4 experimente independente.

Figura 4: Efectul blocării semnalizării de CLEC-1 cu proteina de fuziune CLEC-1 Fc asupra activării celulelor T mediate de BMDC de șobolan.

BMDC-urile de la șobolani WT au fost incubate timp de 4 zile în MLR cu celule T CD4⁺ alogene purificate de la șobolani naivi, împreună cu CLEC-1-Fc sau proteine de fuziune hSEAP-Fc irelevante (produse și purificate în aceleași condiții) (10 μ g / ml). i) Proliferarea celulelor Foxp3⁺ și Foxp3⁻ au fost evaluate în celulele T CD4⁺ prin diluarea CFSE prin citometrie în flux, și ii) producțiile de citokine IL-17 și IFN- γ au fost evaluate în supernatanții MLR prin ELISA. Datele au fost exprimate în histograme ca medie \pm SEM din 4 experimente independente.

Figura 5: Efectul deficienței de CLEC-1 (șobolani KO CLEC-1) asupra primării *in vivo* a celulelor T CD4⁺ mediate de DC și soarta polarizării Th.

A) Expresia ARNm CLEC-1 a fost evaluată prin RT-PCR cantitativă în diferite subtipuri de celule de șobolan CD103⁺ CD4⁻ (prezentare încrucișată) și CD4⁺ (fără prezentare încrucișată) DC convenționale din organe limfoide secundare (SLO) (n = 5, * p < 0,05).

B) Șobolani WT și CLEC-1 au fost imunizați subcutanat în tampon cu CFA plus proteină KLH (100 μ g / ml). În ziua 10 după imunizare, ganglionii limfatici poplitei au fost recoltați și cultivați în prezența de KLH sau martor OVA (25 μ g / ml) timp de 3 zile. Histogramele și graficele reprezentative ale i) Proliferarea în T CD4⁺ evaluată prin diluarea CFSE, și ii) proporția celulelor IL-17⁺, IL-17⁺ IFN- γ ⁺ și IFN- γ ⁺ printre celulele T CD4⁺ închise, evaluate prin citometrie în flux. Datele au fost exprimate în histograme ca medie \pm SEM din 4 experimente independente.

Figura 6: Efectul potențialului antagonist al CLEC-1 asupra activării MLR (moDC-uri + Allo T).

MLR a fost format din celule T purificate izolate din sânge periferic (5×10^4) amestecat cu celule dendritice derivate din monocite alogene ($12,5 \times 10^3$) exprimând un nivel ridicat de CLEC-1. Controlul izotipului (IgG1) sau anticorpur anti-uman CLEC-1 au fost adăugați la doze de 0,5 până la 10 μ g / ml timp de 5 zile. Proliferarea celulelor T a fost apoi evaluată prin diluția succinimidil esterului de carboxifluoresceină și expresia IFN- γ evaluată prin citometrie în flux în celulele T și prin ELISA în supernatante (Figurile 6A, B și C, histograme și grafice reprezentative).

Figura 7: Punct de control inhibitor al CLEC-1 în cancer (dovada conceptului la rozătoare).

a) Expresia rapidă și de lungă durată a CLEC-1 în tumorile solide la rozătoare (celule tumorale de hepatocarcinom hepa 1,6 injectate intraportal în ficatul șoarecilor b6, expresia *Clec1a* a fost evaluată prin Q-PCR).

b) rozătoarele cu deficit de CLEC-1 luptă mai bine împotriva tumorii decât șoarecii de tip sălbatic: celulele tumorale de hepatocarcinom hepa 1,6 injectate intraportal în ficatul b6 la șoareci WT sau *Clec1a* deficienți, datele sunt exprimate în % din testul Wilcoxon de supraviețuire la șoareci *** p < 0,001.

c) șobolani: celulele C6 gliomice (1 milion) au fost injectate subcutanat în flancul șobolanilor sprague dawley (spd) WT sau cu deficiență *Clec1a*, și volumul tumorii a fost monitorizat până în ziua 35.

d) Celulele de gliom C6 (1 milion) au fost injectate subcutanat în flancul șobolanilor sprague dawley (spd) WT sau cu deficiență *Clec1a*, iar ganglionii tumorali și limfatici au fost recoltați în ziua 18 și supuși la Q-PCR pentru *inos*, *ifng* și *tnfa*. Datele reprezintă histograme de exprimare a *inos*, *ifng* și *tnfa* relativ la *hprt*, și exprimate în unitate arbitrară (schimbare de n ori în comparație cu expresia la șobolani WT de aceeași generație, valoare de 1) pentru tumori (n = 3) sau în raportul transcrit pentru ganglioni limfatici (n = 6, * p < 0,05).

Figura 8: CLEC-1 este exprimat prin macrofage pro-tumorale de tip M2 și este exprimat de celule mieloide din mezoteliom de efuziune pleurală și din ascită tumorală ovariană.

Monocitele umane au fost cultivate cu M-CSF pentru a genera macrofage M0 și apoi cu IFN γ , LPS sau IL-4 pentru a genera macrofage M1 sau M2, așa cum este descris de Zajac, Blood, 2013). Expresia de CLEC-1 a fost evaluată prin Q-PCR (a) și prin citometrie în flux (b), n = 4 * p < 0,05. Efuziunea pleurală din mezoteliom a fost colectată și supusă citometriei în flux pentru a evalua expresia de CLEC-1 pe celule mieloide CD45⁺ HLA DR⁺ CD16⁺ după blocarea receptorilor Fc cu FcBlock și ser pozitiv AB uman (control izotip) (c). Ascita este colectată în timpul îngrijirii de rutină a pacientului cu carcinom ovarian, și celulele mononucleare sunt izolate după un gradient Ficoll. Celulele CD14⁺ umane sunt izolate folosind microperle CD14 și selecție pozitivă cu AutoMACS. După blocarea receptorilor Fc cu FcBlock și ser

pozitiv AB uman, celulele CD14⁺ au fost colorate fie cu un anticorp monoclonal de control al izotipului, fie cu un CLEC-1 (d) anti-uman.

EXEMPLUL 1:

Material și metode

5 ***Animale***

Șobolanii au fost cumpărați de la "Centre d'Elevage Janvier" (Genest, Saint-Isle, Franța) și procedurile experimentale au fost efectuate în strictă conformitate cu protocoalele aprobate de Comitetul pentru etica experimentelor pe animale din Pays de la Loire și autorizate de Ministerul Învățământului Superior și Cercetării al guvernului francez. Knock-out (KO) Clec-1 a fost generat de facilitatea Transgenic Rats and Immunofenomics Platform (SFR-Santé-Nantes) cu tehnologia nucleaze cu degete de zinc (ZFN) în cadrul Lewis consangvinizat RT1a. Absența proteinei CLEC-1 la dimensiunea preconizată de 32 kDa a fost confirmată prin western blot.

Anticorpi

15 Anticorpi Abs monoclonali anti-umani CLEC-1 (mAb) au fost generați prin hibridizare somatică a limfocitelor (Biotem, Apprieu, Franța) prin imunizarea șoarecilor Balb / c cu o peptidă care codifică domeniul extracelular al hCLEC-1, și au fost selectați prin screening pe proteină CLEC -1 umană recombinantă (sistem RD) prin ELISA, și apoi purificată prin cromatografie pe proteina A. mAb CLEC1 anti-uman (IgG-D6) a fost de la Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, CA). Beta-actină anti-șobolan purificată, CD3 (G4.18); anti-șobolan TCR $\alpha\beta$ -A647 sau -A488 (R73), CD4-PECy7 (OX35), CD8-A488 (Ox8), IL-17-APC (ebio17B7), Foxp3-APC, IFN γ -FITC, CD11b-PerCP-Cy5. 5 (WT.5), CD103 (α E Integrin) -FITC și fosfotirozine anti-umane (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 și controlul izotipului IgG1 provin de la BD Biosciences (Franklin Lakes).

25 ***Generarea de șobolani clec-1 -/- knock-out (KO) prin tehnologia Zinc Finger Nuclease (ZFN).***

Secvențe țintite de ZFN care codifică ARNm transcrise *in vitro* specifice pentru șobolan *clec-1* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) au fost microinjectate în embrioni fertilizați într-o singură celulă, așa cum s-a descris anterior. Mutațiile la nou-născut au fost detectate prin PCR. Unul dintre fondatorii care au prezentat o deleție de 7 bp ducând la un stop-codon prematur la aminoacidul 114 CLEC-1 căruia i-a lipsit de cea mai mare parte a domeniului extracelular. Heterozigoții au fost supuși reproducerii pentru a genera aceeași generație de KO și de tip sălbatic (WT).

Generarea proteinei de fuziune CLEC-1 Fc de șobolan.

35 ADNc-ul care codifică domeniul extracelular al CLEC-1 (aminoacizi 74-261 ADK94891), a fost amplificat prin PCR și capetele 5' și 3' marcate cu situsuri de restricție ECORI Bg1II, respectiv. După digestie, produsele ADNc au fost clonate și inserate în cadrul în vectorul pFUSE-mIgG2Ae1-Fc2 v10 [Fab] (Invivogen, San Diego, CA) care conține fragment IgC2a Fc mutat pe 3 aminoacizi pentru a preveni legarea de Fc γ RRI. Plasmidele au fost transfectate în celule eucariote cu lipofectamină conform instrucțiunilor producătorului (ThermoFisher). CLEC-1 Fc a fost purificat din supernatant cu coloană de afinitate HiTrap g (GE Healthcare Bio-sciences, Pittsburgh, PA), dializată utilizând o casetă Slide-A-Lyzer de dializă (ThermoFisher) și cuantificată folosind kitul de reactivi pentru testarea proteinei BCA (Pierce). Puritatea și structura proteinelor au fost confirmate prin SDS-PAGE, urmată de colorarea Coomassie și analiza western blot cu IgG anti-șoarece sau anticorp CLEC-1 anti-șobolan, așa cum este descris în secțiunea Western blot din Materiale și metode suplimentare. A fost generată o formă trunchiată secretată recombinantă de control a fosfatazei alcaline embrionare umane (hSEAP Fc) (pFUSE-SEAP-hFc, Invivogen), și purificată în aceleași condiții ca și CLEC-1 Fc.

Imunizarea KLH

50 Șobolanii au fost imunizați sc. în tampon cu proteină Keyhole limpet hemocianină (KLH) (Sigma) (100 μ g) emulsificată (v: v) în 100 μ l de adjuvant complet Freund (CFA) (Difco) și ganglionii limfatici popliteali au fost recoltați la 10 zile după imunizare. Totalul celulelor (1×10^5) etichetate cu carboxifluoresceinsuccinimidil ester (CFSE) (Molecular Probes / Invitrogen) (5 μ M) sau Celule T CD4⁺ purificate (1×10^5) plus splenocite epuizate cu celule T (1×10^5) de la șobolani WT naivi au fost supuse *in vitro* la provocare secundară cu KLH sau proteine OVA irelevante (25 μ g / ml) timp de 3 zile.

Citometrie de flux și sortare celulară

55 Înainte de colorare, celulele au fost supuse blocului Fc (BD Biosciences) așa cum este descris în instrucțiunile producătorului. Pentru colorarea citokinelor intra-celulare, celulele au fost stimulate timp de 4 ore cu PMA și ionomicină (50 ng / ml și respectiv 1 μ g / ml) în prezența inhibitorului de transport al proteinelor GolgiStop (2 μ l / godeu), și supuse fixării și permeabilizării (Soluție facspermeabilizantă) (toți reactivii de la BD Biosciences). Marcarea fluorescentă a celulelor colorate (2,5 μ g / ml) a fost măsurată utilizând un FACS LSR II (BD Biosciences) și analizată cu software-ul FlowJo® (Tree Star, Inc., Ashland).

60

Pentru sortarea celulelor, Celulele T de șobolan CD4⁺ și CD11b⁺CD103⁺CD4⁺ și CD11b⁺CD103⁺CD4⁺ DC-urile au fost purificate din splina șobolanilor naivi prin selecție pozitivă folosind un citometru de flux FACSAria (BD Biosciences) prin TCR⁺ și CD4⁺ și prin colorare CD11b, CD103 și respectiv CD4, și pentru celule umane prin SSC^{scăzut}CD45⁺CD3⁺ sau CD19⁺ pentru celulele T și, respectiv, B, SSC^{ridicată}CD45⁺CD16⁺ pentru neutrofile, SSC^{scăzut}CD45⁺CD14⁺ pentru monocite, și SSC^{scăzut}CD45⁺HLA-DR⁺CD11c⁺, pentru cDC-uri. Puritatea a fost > 99%.

Celulele moarte au fost excluse prin închidere pe celule negative de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Generarea celulelor, stimularea in vitro și reacția leucocitară mixtă (MLR)

DC-urile derivate din monocite umane (moDC-uri) au fost generate din monocite elutriate cultivate timp de 7 zile în mediu complet RPMI 1640 (10% FCS fără endotoxine (Perbio Sciences), 2 mM L-glutamină (Sigma), 1 mM piruvat de sodiu (Sigma), 1 mM Hepes (Sigma) și 5x10⁻⁵ M 2-mercaptoetanol (Sigma)), suplimentat cu IL-4 (40 ng / ml; AbCys, Paris, Franța) și GM-CSF (1000 UI / ml; AbCys). Apoi, celulele au fost stimulate 24 ore (1X10⁶/ ml) cu LPS (0,5 μg / ml) (Sigma), Poly I: C (2 μg / ml) (Invivogen, San Diego, CA), R848 (2,5 μg / ml) (Invivogen), TGFβ1 uman recombinant (20 ng / ml) (R&D Systems), alternativ, în prezența a 10 μg / ml de control izotip anti-CLEC-1 mAb sau IgG1 acoperit anterior pe plăci), și au fost supuse citometriei în flux sau cultivate (12,5X10³) cu 5X10⁴ celule T umane alogene (set de izolare a celulelor T Pan (Mylteni)) timp de 5 zile (MLR). Eticheta recombinantă CLEC-1-His (R&D Systems) sau proteine recombinante irelevante de porc alfa, 3GT-6-His, au fost adăugate la 10 μg / ml în MLR. Proliferarea a fost măsurată prin citometrie în flux prin profilul CFSE în celule CD3⁺CD4⁺ și citokinele IL-17 și IFN-γ evaluate în supernatante prin ELISA.

Celulele endoteliale umane (EC) din aortă (HAEC) sau din venă ombilicală (HUVEC) au fost izolate și cultivate și au fost alternativ stimulate cu 1000 de unități / ml de TNFα (eBiosciences) uman recombinant timp de 12 ore.

Monocitele umane au fost cultivate cu M-CSF pentru a genera macrofage M0 și apoi cu IFNγ, LPS sau IL-4 pentru a genera macrofage M1 sau M2 așa cum este descris de Zajac, Blood, 2013).

Efuziunea pleurală de la pacienții cu mezoteliom a fost colectată și supusă citometriei de flux

Ascita este colectată în timpul îngrijirii de rutină a pacientului cu carcinom ovarian și celulele mononucleare sunt izolate după un gradient Ficoll. Celulele CD14⁺ umane sunt izolate folosind microperle CD14 și selecție pozitivă cu AutoMACS.

Celulele T CD4⁺ de șobolan au fost stimulate cu anti-CD3 legat de plăci (Clona G4.18) (5 μg / ml). DC-urile derivate din măduva osoasă (BMDC) de la șobolani naivi, CLEC-1 WT și KO LEW.1A (RT1a) au fost obținute cultivând celule timp de 8 zile în mediu RPMI complet suplimentat cu IL-4 de șobolan (4 ng / ml) și GM-CSF murin (1,5 ng / ml). Apoi, BMDC-urile au fost stimulate cu LPS (1 μg / ml) (Sigma) sau zimozan (20 μg / ml) (Invivogen) timp de 6 ore pentru analiza transcriptului și timp de 24 de ore pentru exprimarea markerilor de maturare și pentru MLR (co-cultură de 5 zile cu celule T CD4⁺ alogene purificate de la ganglionii limfatici mezenterici de șobolani naivi LEW.1W (RT1u) etichetați cu 5 μM CFSE). Alternativ, proteina de fuziune CLEC-1 Fc de șobolan și hSEAP-Fc martor (10 μg / ml) au fost adăugate în MLR în prezența inhibitorului endotoxinei polimixina B (10 μg / ml) (Invivogen).

Extracția de ARN și RT-PCR cantitativă în timp real

ARN-ul total din țesuturi, tumori sau celule a fost preparat folosind Trizol (Invitrogen) conform instrucțiunilor producătorului. ADNc din organele umane grupate provine de la Human Immune System și grupul MTC I de bărbați sau femei caucazieni (Clontech Mountain View). PCR cantitativă în timp real a fost realizată utilizând sistemul PCR în timp real ViiA 7 și mixul SYBR® Green PCR Master (Applied Biosystems). Hipoxantin-guanina fosforibosiltransferaza (HPRT) a fost utilizată ca genă de control endogenă pentru a se normaliza pentru variații ale cantității inițiale de ARN. Expresia relativă a fost calculată folosind metoda 2^{-ΔΔCt} și exprimată în unități arbitrare.

Imunoprecipitarea și Western blot

MoDC-urile umane au fost plasate pe plăci acoperite mAb cu izotip anti-CLEC-1 sau cu izotip IgG1 (Invitrogen) (10 μg / ml) timp de 5 sau 20 de minute în mediu împreună sau fără zimozan (20 μg / ml). MoDC-urile umane, HAEC, HUVEC și HEK au fost lizate în tampon de liză Nonidet P-40 1% cu cocktail de inhibitori de protează (Sigma Aldrich). Imunoprecipitarea de CLEC-1 a fost efectuată cu 4 μg de mAb anti-uman CLEC1 (D6) urmată de incubare cu perle de proteină G-Sefaroză. Proteinele au fost apoi tratate peste noapte cu PNGază F (Sigma Aldrich), eluate și dizolvate prin fierbere timp de 5 minute în tampon de probă Laemmli. Concentrația de proteine a fost determinată utilizând setul de teste BC cu BSA ca standard (Interchim, San Pedro). Membranele de nitroceluloză au fost blocate cu soluție salină tamponată Tween-20-Tris și lapte 5% și incubate cu 0,5 μg / ml de antifosfotirozină (4G10) sau 2 μg / ml

de mAb-uri anti CLEC1, urmate de Ab-uri secundare conjugate cu peroxidază de hrean (Jackson immunoresearch, West Grove, PA.). Kitul Proteome Profiler Human NF-PathB Pathway Array a fost realizat așa cum este descris în instrucțiunile producătorului (R&D System). Detectarea prin chemiluminescență a fost efectuată folosind substratul de chemiluminescență West Pico (Thermofisher scientific, Waltham, MA) și expresia proteinelor evaluate cu Las 4000 (Fuji).

Imunohistochimie

Neutrofilele, moDC-urile, celulele HEK293T transfectate aderent și celulele HUVEC (cultivate pe o lamă de acoperire peste noapte) au fost fixate în paraformaldehidă 4% (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, SUA) și permeabilizate, cu excepția moDC-urilor cu Triton X100 (0,1%). Celulele au fost colorate cu mAb anti-CLEC1 (D6) sau control izotip IgG1 (Invitrogen) (4 μg / ml) timp de 1 oră la temperatura camerei în PBS 1% FCS, BSA 1% și bloc Fc pentru moDC și apoi cu Alexa Fluor 488 secundar sau anticorpi IgG1 anti-șoarece Alexa Fluor 568, 1 oră. După 10 minute de incubare în PBS conținând 1% DAPI, lamele au fost montate folosind reactiv Prolong Antifade (Invitrogen) și observate prin microscopie cu fluorescență (microscop confocal Nikon A1 R Si). Au fost obținute imagini (X60 Plan Apo N.A: 1.4, zoom 2) cu modul secvențial și analizate utilizând programul ImageJ.

Modele de tumori in vivo

Celulele tumorale hepa 1.6 de hepatocarcinom au fost injectate intraportal în ficatul de șoareci deficienți b6 WT sau *Clec1a*. Celulele de gliom C6 (1 milion) au fost injectate subcutanat în flancul șobolanilor sprague dawley (spd) cu deficiență WT sau *Clec1a*.

Analize statistice

Toate analizele statistice au fost efectuate folosind software-ul Graphpad Prism (La Jolla) cu testul t student nepereche neparametric cu două cozi (Mann-Whitney). Rezultatele au fost considerate semnificative dacă valorile p au fost <0,05.

Rezultate

DC-urile mieloido umane exprimă CLEC-1 la suprafața celulei.

Doar informații limitate au fost publicate până acum cu privire la expresia CLEC-1 la om. Foarte puține au fost descrise până acum cu privire la expresia, reglarea și funcția proteinei CLEC-1 umane. Există o singură publicație despre expresia CLEC-1 care dezvăluie că CLEC-1 uman ar putea fi detectat doar intracelular în celulele endoteliale cu un model de colorare asemănător proteinelor reticulului endoplasmatic, și că nici TGF-β, nici stimulii inflamatori nu ar putea promova o translocare semnificativă la suprafața celulei. (Receptorul CLEC-1 asemănător lectinei de tip C uman este reglat în sus de TGF-β și localizat în principal în compartimentul membranei endoplasmice. Sattler și colab., ScandJImmunol. 2012 mar; 75 (3): 282-92). Astfel, singurele informații disponibile în stadiul tehnicii privind hCLEC-1 (adică, localizarea intracelulară în celulele endoteliale) este contrară a ceea ce se știa la șobolan (adică; rCLEC-1 localizat pe suprafața celulelor endoteliale și mieloido).

Inventatorii au observat prin RT-PCR cantitativă o expresie puternică a transcrierilor CLEC-1 în plămâni și placentă și o expresie mai moderată în organele limfoide, cum ar fi timusul, ganglionii limfatici, splina și amigdalele (datele nu sunt prezentate). În subtipurile de celule umane, transcriptii CLEC-1 abundente au fost găsite în neutrofile, monocite, moDC-uri și HAEC-uri (Figura 1A) și nu a fost detectat niciun transcript în celulele T și B. Prezența proteinei CLEC-1 în moDC-uri și EC-uri a fost confirmată prin imunoprecipitare de CLEC-1 urmată de Western blot (date neprezentate) și contrastează cu cantitatea mică observată în celulele HEK epiteliale. Inventatorii au generat un mAb anti-uman CLEC-1 de șoarece îndreptat împotriva domeniului extracelular și au observat o expresie ectopică scăzută a lui CLEC-1 la suprafața celulei celulelor HEK transfectate, coroborând ceea ce a fost descris anterior în literatură (datele nu sunt prezentate). Cât pentru alte CLR-uri, CLEC-1 poate necesita alte lanțuri de adaptoare, alte PRR-uri sau o glicozilare suficientă pentru o expresie eficientă, transport și stabilitate la suprafața celulei. Expresia suprafeței celulare a proteinei CLEC-1 a fost confirmată prin imunohistochimie în celulele transfectate (datele nu sunt prezentate).

Cu mAb generat, au demonstrat prin citometrie în flux, pentru prima dată, după cunoștințele noastre, expresia celulară a suprafeței CLEC-1 pe o subpopulație de DC-uri CD16⁻ mieloidă din sânge uman circulant (CD45⁺CD14⁺HLA-DR^{ridicat}CD11c⁺) și pe monocite CD14⁺CD16⁺ (CD45⁺CD14⁺CD16⁺). Nici o expresie la suprafața celulară nu a fost observată pe subpopulația DC mieloidă BDCA3⁺ (BDCA3⁺CD45⁺HLA-DR^{ridicat}CD11c^{scăzut}) și nici pe plasmocitoide CD123⁺DC (CD123⁺CD11c^{HLA-DR^{ridicat}}) (datele nu sunt afișate). Expresia scăzută a CLEC-1 a fost observată la suprafața celulei neutrofilelor sau HAEC pentru care expresia este așa cum a fost raportată anterior, mai ales intra-celulară (Figura 1B). Aceași localizare a proteinei CLEC-1 a fost observată prin imunohistochimie cu o colorare intracelulară CLEC-1 în neutrofile și EC-uri umane și o expresie la suprafața celulară pe DC-uri (datele nu sunt prezentate). Important, în mod similar cu ceea ce s-a descris anterior la șobolan, inventatorii au observat că expresia CLEC-1 la om este reglată în jos pe DC-uri de către stimuli inflamatori precum liganzi TLR, și reglată în sus de TGFβ (reprezentări ale punctelor reprezentative și histograma MFI, Figura 1C respectiv).

Declanșarea de CLEC-1 pe moDC-urile umane suprimă activarea Th17 alogenă in vitro din aval.

Deoarece liganzii naturali CLEC-1 nu au fost încă identificați, inventatorii au folosit mAb anti-CLEC-1 anti-uman pentru a imita ligandul și legătura încrucișată CLEC-1 la suprafața celulei moDC-urilor. După imunoprecipitarea de CLEC-1 în condiții stricte reduse, nu s-a observat prin Western blot nicio fosforilare cu tirozină la dimensiunea așteptată a CLEC-1 (32 kDa) după declanșarea de CLEC-1, sugerând că motivul tirozinei din coada citoplasmatică nu este fosforilat direct (datele nu sunt afișate). Cu toate acestea, s-au observat mai multe modificări ale modelelor de fosforilare a tirozinei cu fosforilarea mărită sau scăzută a mai multor benzi în jurul dimensiunii 40-50 kDa, sugerând puternic că respectiv CLEC-1 este un receptor funcțional care semnalizează prin intermediul partenerilor de legare care rămân să fie identificați.

Inventatorii au investigat apoi dacă declanșarea de CLEC-1 modulează maturarea indusă de TLR a moDC-urilor așa cum este descris pentru alte CLR activatoare sau inhibitoare. Ei au observat că declanșarea de CLEC-1 nu se induce de la sine și nici nu potențează sau suprima starea de maturare indusă de LPS a moDC-urilor în conformitate cu expresia markerilor de activare CD80, CD86, CD83 și HLA-DR (Figura 2A) și producției de TNF α , IL-12, IL-6, IL-23 sau IL-10 (Figura 2B). Rezultate similare au fost observate cu alți liganzi TLR (datele nu sunt prezentate).

Apoi, inventatorii au evaluat efectul declanșării de CLEC-1 asupra capacității moDC-urilor de a polariza un răspuns alogen al celulelor T. Nu s-a observat nicio diferență în proliferarea alogenă ulterioară a celulelor T după declanșarea de CLEC-1 singur (Figura 2C) sau în combinație cu TLR (datele nu sunt prezentate). Cu toate acestea, au denotat semnificativ mai puțin IL-17 și mai mult IFN γ secretat de celulele T alogene sugerând că declanșarea de CLEC-1 pe moDC a redus activarea de Th17 alogenă ulterioară și a înclinat răspunsul către un Th1 (Figura 2C).

Având în vedere că semnalizarea CLR a condus la activarea NF- κ B, au investigat nivelul și activarea proteinelor legate de calea NF- κ B de către Proteome Profiler după declanșarea de CLEC-1 singur sau în asociere cu zimozan, un agonist atât al căilor de semnalizare DECTIN-1, cât și al TLR. Inventatorii au observat că, spre deosebire de zimozan, declanșarea de CLEC-1 nu induce de la sine activarea căii NF- κ B evaluată prin degradarea inhibitorului NF- κ B, I κ B α și prin fosforilarea subunității RelA p65 (Ser529) (datele nu sunt afișate). Cu toate acestea, ei au notat că respectiv conjuncția declanșării de CLEC-1 a redus degradarea de I κ B α indusă de zimozan. Cu toate acestea, nu s-a observat nicio reducere semnificativă a fosforilării subunității p65. Deoarece fosforilarea la Ser529 este independentă de IKK β , aceste date sugerează că CLEC-1 poate inhiba în special calea de activare IKK β . Colectiv, aceste date sugerează că declanșarea de CLEC-1 pe moDC-urile umane este funcțional activă și că, deși nu s-a observat niciun efect semnificativ asupra producției de citokine, poate regla căile de semnalizare NF- κ B induse de PRR-uri pentru a modula fin starea lor de activare și a suprima răspunsul Th17 din aval.

Întreruperea semnalizării de CLEC-1 la BMDC-uri de șobolan îmbunătățește răspunsurile celulelor T in vitro.

Pentru a obține informații despre funcția CLEC-1, inventatorii au generat șobolani deficienți în CLEC-1. Șobolani cu deficiență de CLEC-1 au fost viabili, sănătoși și s-au născut din reproducerea heterozigoților cu frecvența Mendeliană așteptată. La starea de echilibru, șobolani cu deficiență de CLEC-1 au prezentat compartimente cu celule imune mieoide și limfoide obișnuite în sânge și organe limfoide periferice (datele nu sunt prezentate).

Inventatorii au generat BMDC-uri de la șobolani deficienți în CLEC-1 și au observat că aceste celule se diferențiază și se maturizează în mod normal ca răspuns la stimularea LPS (CD80, CD86, MHC Clasa I și II) (datele nu sunt prezentate). Interesant, au observat că, după activarea de către LPS sau zimozan, BMDC-urile cu deficit de CLEC-1 au exprimat un nivel mai ridicat de transcrieri IL-12p40 decât BMDC-urile de la șobolani de tip sălbatic (datele nu sunt prezentate). Nu s-a observat nicio diferență semnificativă pentru expresia de IL-6, IL-23, TGF β și IL-10. Cu toate acestea, în mod impresionant, BMDC cu deficit de CLEC-1 au indus o proliferare sporită a celulelor T alogene CD4⁺ care a fost asociată cu o activare crescută a celulelor T Th17 (Figura 3).

Pentru a confirma în continuare aceste date, inventatorii au generat proteina de fuziune CLEC-1 Fc de șobolan (datele nu sunt prezentate). Această proteină de fuziune a constatat din domeniul extracelular al CLEC-1 de șobolan fuzionat la fragmentul IgG Fc mutat pe 3 aminoacizi pentru a preveni legarea Fc γ R, ar trebui să blocheze interacțiunile CLEC-1 asupra BMDC-urilor cu liganzii săi puternici și astfel să imite deficiența de CLEC-1. În mod similar, au observat în prezența proteinei de fuziune CLEC-1 Fc în MLR *in vitro*, o proliferare mai proeminentă a celulelor T efectoare alogene non-Foxp3 și mai multă activare de Th17 (Figura 4). Important, nu s-a observat nicio inducție a lui Th-17 cu CLEC-1 Fc pe celulele T purificate după activarea policlonală anti-CD3 (datele nu sunt prezentate), demonstrând că acest efect a fost specific pentru întreruperea semnalizării CLEC-1 în BMDC-uri și nu datorită ligaturii CLEC-1 Fc, și efect agonist asupra unui ligand puternic asupra celulelor T.

Luete colectiv, aceste date sugerează că absența semnalizării de CLEC-1 în celulele mieloide, în special în DC-uri, a îmbunătățit starea lor de activare necesară pentru proliferarea *in vitro* și activarea eficientă a celulelor T.

Deficitul de CLEC-1 îmbunătățește răspunsul in vivo al celulelor T mediat de DC.

5 Inventatorii au investigat apoi funcția potențială a lui CLEC-1 *in vivo* în diferențierea Th mediată de DC după imunizarea prin injecție subcutanată cu antigenul străin hemocianină keyhole limpet (KLH) și adjuvant Freund complet. În primul rând, au evaluat expresia transcrierilor CLEC-1 în diferite subtipuri de CD-uri CD103⁺ CD11b⁺ în ganglionii limfatici. Interesant, au observat că expresia de CLEC-1 este limitată la DC-uri CD4⁺corespunzătoare la DC CD8 α ⁺ la șoareci specializați în fagocitoza celulelor moarte și care prezintă activitate citotoxică (Figura 5A).

10 După imunizare, au observat după provocarea secundară *in vitro* a drenării ganglionilor limfatici, o proliferare crescută a celulelor T CD4⁺ specifice KLH de la șobolani deficienți CLEC-1 imunizați care au fost asociați cu un număr crescut de Celule T CD4⁺ IL-17⁺, IL-17⁺IFN γ ⁺ și IFN γ ⁺ (histogramă și puncte reprezentative, Figura 5B). Important, un răspuns îmbunătățit de rechemare la KLH a fost observat și cu celulele T CD4⁺ purificate de la șobolani deficienți CLEC-1 imunizați în prezența DC-urilor de la șobolani de tip sălbatic care demonstrează o creștere specifică a primării celulelor T *in vivo*, în absența de CLEC-1 (datele nu sunt prezentate).

Aceste date demonstrează *in vivo* că deficiența semnalizării de CLEC-1 în cDC-uri exacerbează răspunsul imun mediat de celule T în aval.

20 **Discuție**

În acest studiu, inventatorii au demonstrat pentru prima dată, după cunoștințele noastre, că CLEC-1 uman este un receptor funcțional de reglare a suprafeței celulei DC care suprimă răspunsul Th17 efector ulterior. Mai mult, șobolani deficienți de CLEC-1 au dezvoltat un rol *in vivo* pentru CLEC-1 în prevenirea primării de celule T CD4⁺ mediate de DC excesiv. La fel ca la șobolan, au observat că expresia de CLEC-1 în moDC-urile umane este scăzută de stimuli inflamatori și este reglată în sus de TGF β . Acest profil de expresie în DC cu o scădere după stimularea inflamatorie reprezintă un răspuns clasic observat pentru alți receptori inhibitori, cum ar fi MICL sau DCIR, care s-au dovedit a suprima răspunsurile *in vivo* și inflamația celulelor T (Uto T. și colab. Clec4A4 is a regulatory receptor for dendritic cells that impairs inflammation and T-cell immunity. Nat Commun. 2016;7:11273) (Redelinguys P, și colab. MICL controls inflammation in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2015). Interesant, inventatorii au descoperit că CLEC-1 este exprimat la șobolan de către subpopulația CD4⁺ de cDC-uri în organele limfoide. Această subpopulație de DC corespunde la contrapartea de șoareci DC CD8 α ⁺ implicați în activitatea citotoxică și fagocitoza celulelor moarte și este descrisă ca fiind principalii producători de IL-12, și implicați în prezentarea încrucișată a antigenelor tumorale. Acest model de expresie contrastează cu receptorul inhibitor DCIR-2 care s-a dovedit a fi limitat la cDC-uri CD8 α . Cu toate acestea, în sângele uman, CLEC-1 a fost observat a fi exprimat la suprafața celulei pe o subpopulație de DC-uri mieloide CD16⁺CD14⁻ și nu pe DC-uri BDCA3⁺, omologii umani ai DC-urilor CD8 α ⁺. Această discrepantă între om și rozătoare justifică investigații suplimentare. Inventatorii au observat că întreruperea semnalizării de CLEC-1 îmbunătățește în special activarea de Th17 mediată de DC *in vitro*, dar atât răspunsurile Th1 cât și Th17 au fost crescute după imunizare *in vivo*. Acest lucru sugerează că CLEC-1 poate suprima în mod diferit răspunsurile Th1 și Th17 în conformitate cu implicarea în comun a PRR. În schimb, DECTIN-1 care acționează ca un receptor de activare în DC-uri, promovează în mod diferit echilibrul Th17 / Th1 în funcție de liganzi și co-angajarea PRR prin reglarea fină a secreției citokinelor polarizatoare IL-12 și IL-23 (Gringhuis SI și colab. 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, și colab. 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, și colab. 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). De exemplu, ca răspuns la provocarea *Aspergillus Fumigatus*, DECTIN-1 a fost arătat la șoareci ca potențând diferențierea de Th17, în special prin scăderea expresiei de IFN- γ și IL12p40, reducând astfel polarizarea de Th1. În mod curios, inventatorii nu au observat că semnalizarea de CLEC-1 în DC-uri suprimă expresia indusă de PRR a citokinelor polarizante Th17, și au observat doar un efect asupra producției de IL-12p40 asupra BMDC-urilor KO de șobolan. Aceste rezultate sugerează că CLEC-1 în DC-uri poate modela echilibrul Th17 / Th1 prin alte mecanisme decât expresia citokinelor polarizante. De exemplu, s-a arătat că semnalizarea de DECTIN-1 influențează soarta polarizării celulelor T prin modularea expresiei ligandului de oxigenare a moleculelor costimulatoare Ox40 pe DC (Joo H și colab. 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). Interesant, inventatorii au observat că declanșarea de CLEC-1 pe DC-urile umane previne degradarea de I κ B α indusă de semnalizarea de DECTIN-1. Prin urmare, CLEC-1 poate preveni, de asemenea, calea de semnalizare Card9 mediată prin activarea CLR-urilor și cunoscută că susține în mod specific răspunsul Th17.

Ei nu au fost capabili să detecteze cu proteina de fuziune Fc CLEC-1 pe celulele care exprimă liganzi endogeni. Cu toate acestea, datele lor sugerează că liganzii CLEC-1 pot fi exprimați de celulele hematopoietice sau eliberați „în mod natural” sau în contextul particular al deteriorării țesuturilor sau celulelor. Liganzii pot fi exprimați de celulele care exprimă CLEC-1 în sine, așa cum este cazul pentru DCIR-2, sau alternativ pentru celulele T. Ligandul endogen DECTIN-1 a fost raportat a fi exprimat de celulele T care, spre deosebire de CLEC-1, acționează ca o moleculă costimulatoare care sporește proliferarea celulelor T (Ariizumi K și colab. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. J Biol Chem. 2000;275(26):20157-20167).

Aceste constatări stabilesc relevanța CLEC-1 în DC-uri în controlul strict al gradului și calității activării celulelor T în aval, și ca receptor de suprafață celulară poate oferi un instrument terapeutic pentru manipularea răspunsului celulelor T.

Prin urmare, CLEC-1 ca receptor inhibitor de suprafață celulară în celulele mieloidă evidențiază o țintă potențială pentru intervenția terapeutică, și o nouă paradigmă de tratament în cancer.

Mai multe studii experimentale demonstrează că CLR-urile contribuie la progresia cancerului și la răspândirea metastatică prin funcția lor în adeziunea celulară sau în modelarea răspunsului celulelor T ((Yan, Kamiya și colab. 2015; Ding, Yao și colab. 2017). De exemplu, s-a demonstrat că receptorii imunomodulatori DC-SIGN, MINCLE, DCIR și BDCA-2 inhibă activarea celulelor mieloidă, inflamația, și sunt critici pentru a conduce extinderea de Tregs Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ (Yan, Kamiya și colab. 2015; Ding, Yao și colab. 2017). DC-SIGN recunoaște antigenul carcinoembrionar supraexprimat pe aproape tot carcinomul uman (Nonaka, Ma și colab. 2008) și promovează secreția citokinelor imunosupresoare IL-10 și IL-6 de către celulele mieloidă. În plus, s-a constatat că polimorfismele din promotorul genei DC-SIGN sunt asociate cu un risc crescut la pacienții cu cancer colorectal (Lu, Bevier și colab. 2013). MINCLE s-a dovedit a fi îmbunătățit în leucocitele infiltrante tumorale în adenocarcinomul ductal pancreatic și mai ales în celulele mieloidă supresive (MSC). Ligarea MINCLE cu SAP130 (o subunitate a complexului histonă deacetilază) eliberată din celulele pe moarte induce o supresie peri-tumorală puternică (Seifert, Werba și colab. 2016). În mod similar, CLR LOX-1 s-a dovedit a fi îmbunătățit în mod specific la suprafața celulară a sângelui sau neutrofilelor care se infiltrază în tumori (15 până la 50%) la pacienții cu cancer, în timp ce este aproape nedetectabil în sângele donatorilor sănătoși (Condamine, Dominguez și colab. 2016). În acest studiu, au arătat că stresul reticulului endoplasmatic induce expresia de LOX-1 și convertește neutrofilele în CSM cu funcție supresivă puternică.

Dimpotrivă, s-a demonstrat că declanșarea semnalizării activării de CLR, cum ar fi DECTIN-1, crește imunitatea anti-tumorală și scade Tregs și MSC (Tian, Ma și colab. 2013). Administrarea beta-glucanilor, un ligand al DECTIN-1, inhibă creșterea tumorii în modelele de carcinom murin (Li, Cai și colab. 2010; Masuda, Inoue și colab. 2013; Tian, Ma și colab. 2013), în melanomul uman, neuroblastom, modelele xenogrefe de limfom (Modak, Koehne și colab. 2005), precum și în cancerul ovarian și gastric uman (Inoue, Tanaka și colab. 1993; Oba, Kobayashi și colab. 2009).

Prin urmare, îmbunătățirea activării celulelor DC sau, mai pe larg, a celulelor mieloidă de către antagonistul CLEC-1 poate reprezenta o țintă a punctului de control imun pentru a modula imunul celulelor T efector în aval, fapt care ar putea avea implicații clinice importante în cancer.

EXEMPLUL 2

Inventatorii au arătat anterior la șobolan că blocada CLEC-1 cu proteina de fuziune CLEC-1 Fc sporește proliferarea celulelor T într-o reacție leucocitară mixtă (MLR) (vezi EXEMPLUL 1). Au generat mai multe mAb-uri direcționate împotriva părții extracelulare a CLEC-1 uman, și arată că un mAb pare antagonist al semnalizării CLEC-1 și, astfel, îmbunătățește proliferarea celulelor T și producția de IFN- γ în reacția leucocitară mixtă (MLR). MLR a fost formată din celule T purificate izolate din sânge periferic (5×10^4) amestecat cu celule dendritice derivate din monocite alogene ($12,5 \times 10^3$) exprimând un nivel ridicat de CLEC-1. Controlul izotipului (IgG1) sau anticorpul anti-uman CLEC-1 au fost adăugați la doze de 0,5 până la 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ timp de 5 zile. Proliferarea celulelor T a fost apoi evaluată prin diluția esterului de succinimidil carboxifluoresceină și expresia IFN γ evaluată prin citometrie în flux în celulele T, și prin ELISA în supernatante (Figurile 6A și 6B, histogramele 6C și graficele reprezentative).

EXEMPLUL 3

CLEC-1 este extrem de exprimat în tumori și joacă un rol funcțional în imunitatea tumorii

Într-un model de hepatocarcinom de șoarece (injecție intraportală de celule tumorale hepa 1.6), inventatorii au observat o expresie crescută și de lungă durată a lui CLEC-1 în tumori (Figura 7a). Important, în acest model, șoarecii deficienți în CLEC-1 oferiți de Derrick J. Rossi, Harvard Stem Cell Institute, Cambridge) sunt mai rezistenți la creșterea tumorii și prezintă o rată de supraviețuire crescută (supraviețuirea mediană 28 zile în KO versus 21 zile în WT) (Figura 7b). În mod similar, într-un model de gliom de șobolan subcutanat (sc.) (C6), inventatorii au observat regresia totală a tumorilor la 3 din 5 șobolani deficienți în CLEC-1 (generați de tehnologia ZFN în laboratorul nostru) (Figura 7c). Important, prin Q-PCR în tumorile recoltate în ziua 18 după inocularea celulelor tumorale, o expresie a ARNm mai mare de *inos*, *tnfa* și *ifng* a fost evaluată în tumoră de la șobolani deficienți de CLEC-1 (Figura 7d). În

plus, o expresie mRNA mai mare de *ifng* a fost detectată în ganglionii limfatici (Figura 7d). Aceste date demonstrează un răspuns antitumoral mai bun la șobolanii deficienți de CLEC-1, și sugerează că absența CLEC1 a indus mai multe macrofage M1 antitumorale și mai multe celule T citotoxice și Th1.

Expresia de CLEC-1 este limitată la cDC-urile specializate în prezentare încrucișată

5 Interesant este faptul că inventatorii au observat atât la șobolani, cât și la șoareci, că expresia de CLEC-1 de către cDC-urile din organele limfoide secundare este limitată la subgrupul specific de DC-uri specializate în reprezentarea încrucișată a antigenilor (CD4+ la șobolan, CD8α+ la șoareci) (Figura 5A). Aceste celule au prezentat un nivel ridicat de IL-12 și sunt responsabile pentru activarea răspunsului citotoxic al limfocitului T (CTL) CD8+ antitumoral. Prin urmare, acționând ca un receptor inhibitor în
10 aceste subgrupe specializate de DC, declanșarea de CLEC-1 poate împiedica producția de IL-12, prezentarea încrucișată eficientă și răspunsul CTL la antigenele tumorale.

 Inventatorii au observat o expresie mai mare a CLEC-1 atât la transcrieri (a) cât și la nivelul proteinelor (b) pe macrofagele protumorale de tip M2 uman, comparativ cu macrofagele antitumorale de tip M1 sau comparativ cu macrofagele M0 (Figura 8). Mai mult, au observat expresia proteinei de
15 suprafață a celulelor CLEC-1 pe celulele mieloide umane CD45+ HLADR+ CD16+ din mezoteliomul de efuziune pleurală (c) și pe celulele mieloide CD14+ din ascita carcinomului ovarian (d) comparativ cu izotipul martor (Figura 8). Aceste date demonstrează că expresia de CLEC-1 este îmbunătățită asupra celulelor mieloide din microambientul tumorii, și ar putea juca un rol critic în evadarea imună a tumorii.

 În concluzie, având în vedere rezultatele de mai sus (în special rezultatele care arată că proteina
20 de fuziune Fc CLEC-1 și anticorpii direcționați împotriva părții extracelulare a lui CLEC-1 uman sporesc proliferarea celulelor T), pare credibil că antagoniștii de CLEC-1 pot fi utilizați pentru tratamentul cancerului.

25 **LISTA SECVENȚELOR**

<110> INSERM Universite de Nantes OSE Immunotherapeutics

<120> METODE ȘI COMPOZIȚII FARMACEUTICE PENTRU PROMOVAREA RĂSPUNSULUI CELULELOR T

30 <130> BIO16204

<160> 2

<170> Brevet În versiunea 3.5

<210> 1

<211> 206

35 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> SECV ID NR: 1

<400> 1

MD/EP 3529262 T2 2022.01.31

24

Tyr Tyr Gln Leu Ser Asn Thr Gly Gln Asp Thr Ile Ser Gln Met Glu
1 5 10 15

Glu Arg Leu Gly Asn Thr Ser Gln Glu Leu Gln Ser Leu Gln Val Gln
20 25 30

Asn Ile Lys Leu Ala Gly Ser Leu Gln His Val Ala Glu Lys Leu Cys
35 40 45

Arg Glu Leu Tyr Asn Lys Ala Gly Ala His Arg Cys Ser Pro Cys Thr
50 55 60

Glu Gln Trp Lys Trp His Gly Asp Asn Cys Tyr Gln Phe Tyr Lys Asp
65 70 75 80

Ser Lys Ser Trp Glu Asp Cys Lys Tyr Phe Cys Leu Ser Glu Asn Ser
85 90 95

Thr Met Leu Lys Ile Asn Lys Gln Glu Asp Leu Glu Phe Ala Ala Ser
100 105 110

Gln Ser Tyr Ser Glu Phe Phe Tyr Ser Tyr Trp Thr Gly Leu Leu Arg
115 120 125

Pro Asp Ser Gly Lys Ala Trp Leu Trp Met Asp Gly Thr Pro Phe Thr
130 135 140

Ser Glu Leu Phe His Ile Ile Ile Asp Val Thr Ser Pro Arg Ser Arg
145 150 155 160

Asp Cys Val Ala Ile Leu Asn Gly Met Ile Phe Ser Lys Asp Cys Lys
165 170 175

Glu Leu Lys Arg Cys Val Cys Glu Arg Arg Ala Gly Met Val Lys Pro
180 185 190

Glu Ser Leu His Val Pro Pro Glu Thr Leu Gly Glu Gly Asp
195 200 205

<210> 2

5 <211> 24

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> SECV ID NR: 2

10 <400> 2

Cys Glu Arg Arg Ala Gly Met Val Lys Pro Glu Ser Leu His Val Pro
1 5 10 15

Pro Glu Thr Leu Gly Glu Gly Asp
20

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- P. THEBAULT ET AL: "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", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 183, no. 5, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 3099-3108, XP055365226, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.0803767 cited in the application
- US-B1- 8 246 959
- PLATO ANTHONY ET AL: "C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways.", INTERNATIONAL REVIEWS OF IMMUNOLOGY APR 2013, vol. 32, no. 2, April 2013 (2013-04), pages 134-156, XP002769383, ISSN: 1563-5244
- M. ERIKSSON ET AL: "Abstract 121. Targeting C-type lectin receptors with synthetic carbohydrates to modulate immune responses.", GLYCOCONJUGATE JOURNAL, vol. 28, no. 5, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 245-246, XP055365847,

(57) Revendicări:

1. Un antagonist al CLEC-1 uman pentru utilizare în tratamentul unui subiect uman care suferă de cancer.

2. Antagonist pentru utilizare conform revendicării 1, în care subiectul uman suferă de un cancer selectat din grupul format din cancer al căilor biliare, cancer al vezicii urinare, cancer al oaselor, cancer cerebral și al sistemului nervos central, cancer de sân, cancer cervical al bolii Castleman, cancer colorectal, cancer endometrial, cancer esofagian, cancer al vezicii biliare, tumori carcinoide gastrointestinale, boala Hodgkin, limfom non-Hodgkin, sarcom Kaposi, cancer renal, cancer laringian și hipofaringian, cancer hepatic, cancer pulmonar, mezoteliom, plasmacitom, cancer de cavitate nazală și sinus paranasal, cancer nazofaringian, neuroblastom, cancer al cavității bucale și orofaringian, cancer ovarian, cancer pancreatic, cancer penian, cancer hipofizar, cancer de prostată, retinoblastom, rabdomiosarcom, cancer al glandei salivare, cancer de piele, cancer de stomac, cancer testicular, cancer de timus, cancer tiroidian, cancer vaginal, cancer vulvar și cancer uterin.

3. Antagonist pentru utilizare conform revendicării 1 sau 2, în care antagonistul de CLEC-1 uman este un anticorp sau un fragment al acestuia care leagă antigenul.

4. Antagonist pentru utilizare conform revendicării 3, în care antagonistul de CLEC-1 uman este selectat din grupul constând din anticorpi himerici, anticorpi monoclonali umanizați și complet umani; sau fragmente ale acestora care leagă antigenul.

5. Antagonist pentru utilizare conform revendicării 3 sau 4, în care anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia se leagă în mod specific la domeniul extracelular de CLEC-1 uman.

6. Antagonist pentru utilizare conform revendicării 1 sau 2, în care antagonistul de CLEC-1 uman este o polipeptidă.

7. Antagonist pentru utilizare conform revendicării 6, în care polipeptida este un echivalent funcțional de CLEC-1 uman.

8. Antagonist pentru utilizare conform revendicării 7, în care polipeptida este un echivalent funcțional de CLEC-1 uman fuzionat la un domeniu constant de imunoglobulină.

9. Antagonist pentru utilizare conform revendicării 1 sau 2, în care antagonistul de CLEC-1 uman este un aptamer.

10. Antagonist pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1 la 9, în care cancerul este tratat prin promovarea răspunsului celulelor T.

11. Antagonist pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1 la 10, în combinație cu un tratament convențional al cancerului.

12. Antagonist pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1 la 11, în combinație cu un agent selectat dintre un agent chimioterapeutic, o terapie țintită împotriva cancerului, un agent imunoterapeutic sau radioterapie, în special pentru o utilizare simultană, separată sau secvențială.

13. Antagonist pentru utilizare conform revendicării 12, în care agentul este selectat din grupul constând dintr-un agent citotoxic, un agent anti-angiogen, un agent imunogen anti-cancer, un agent de control al ciclului celular / reglator al apoptozei, un anticorp anti-cancer și un agent de reglare hormonală.

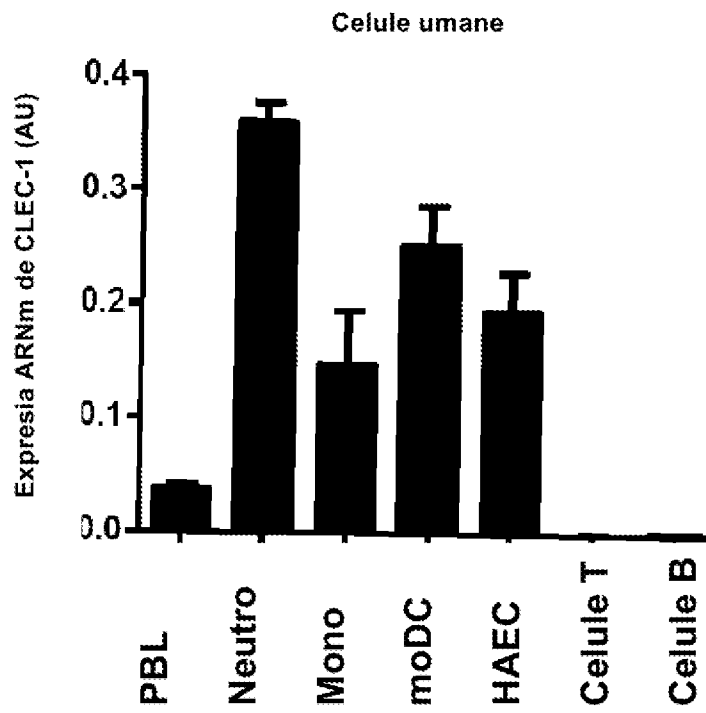


Figura 1A

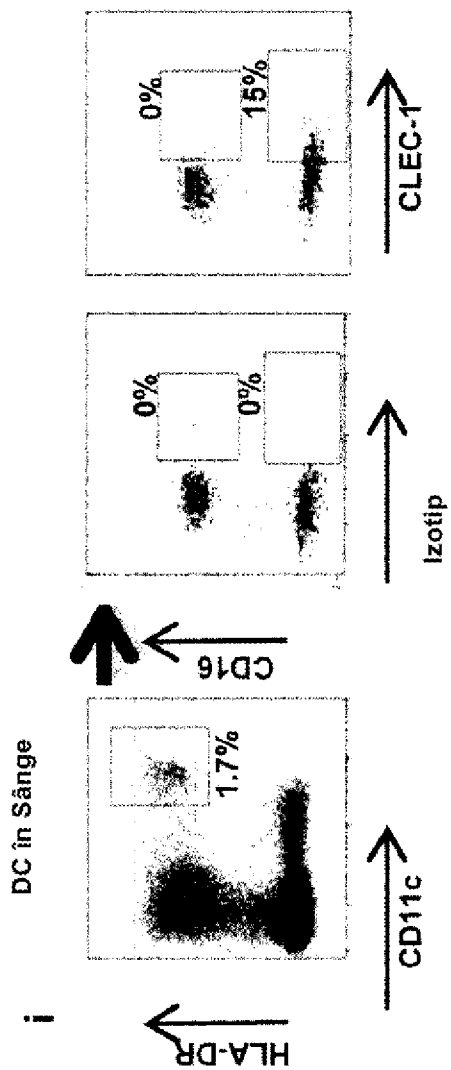


Figura 1B (i)

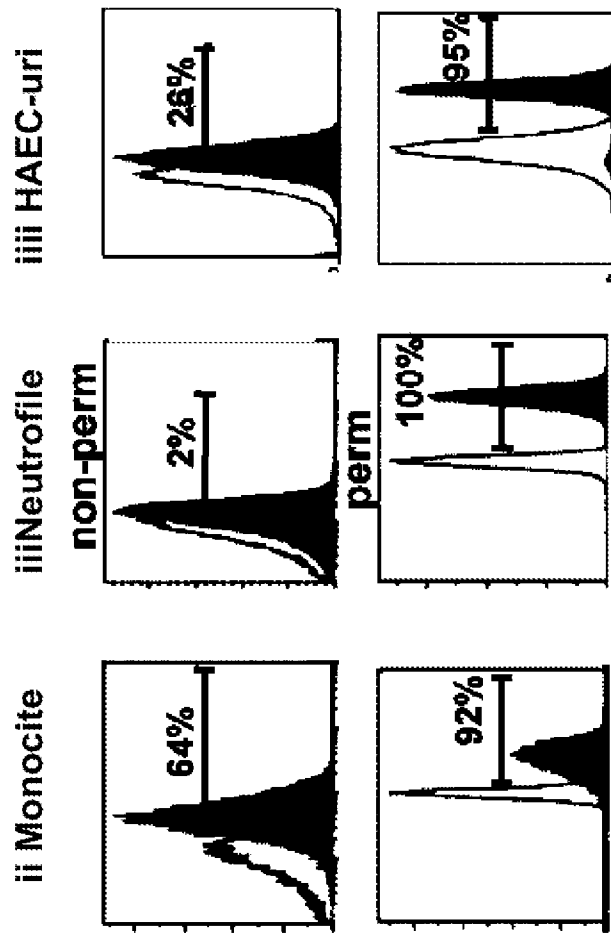


Figura 1B (ii)

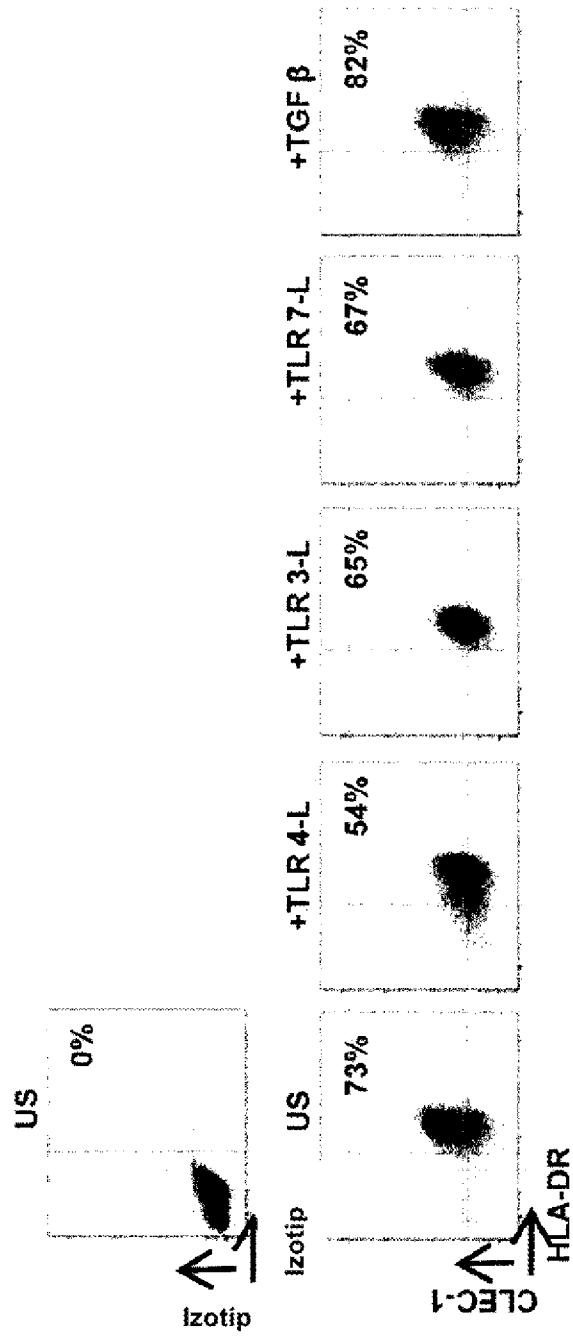


Figura 1C

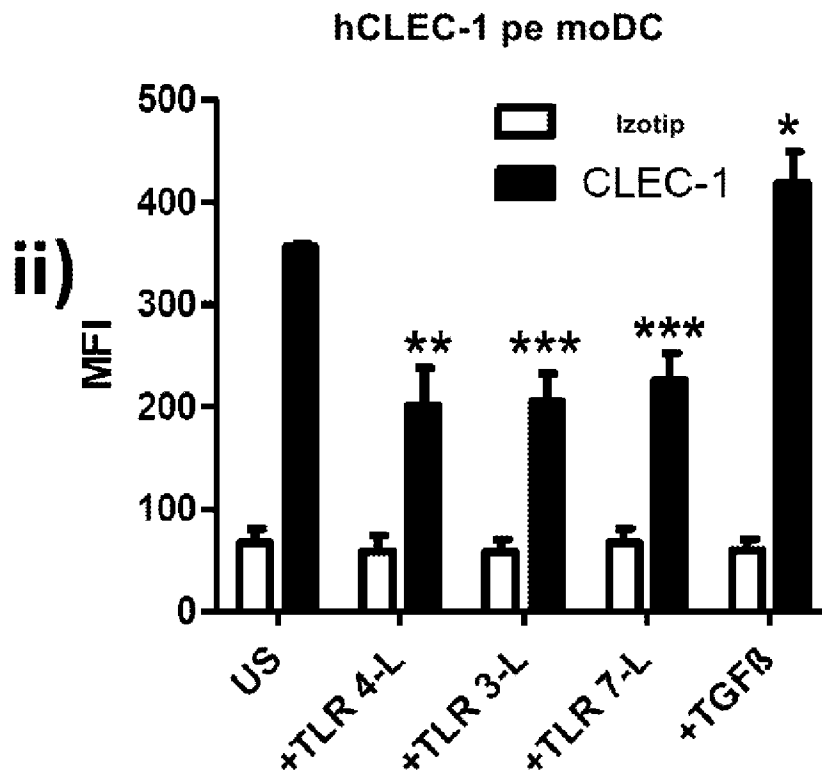


Figura 1C (partea a doua)

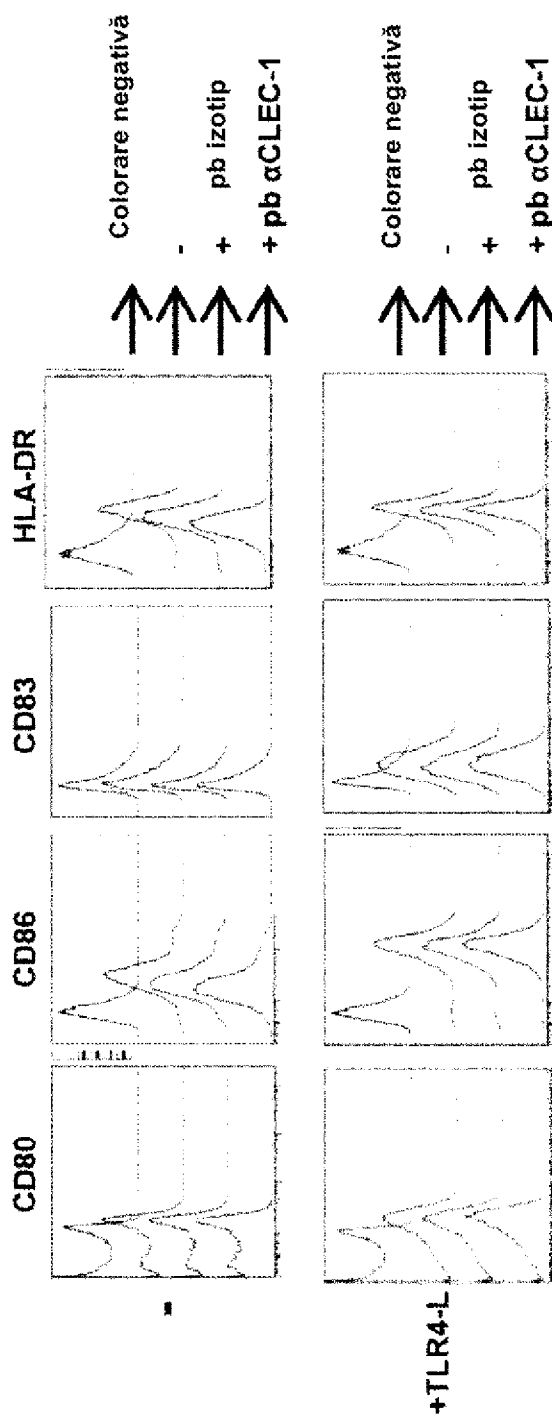


Figura 2A

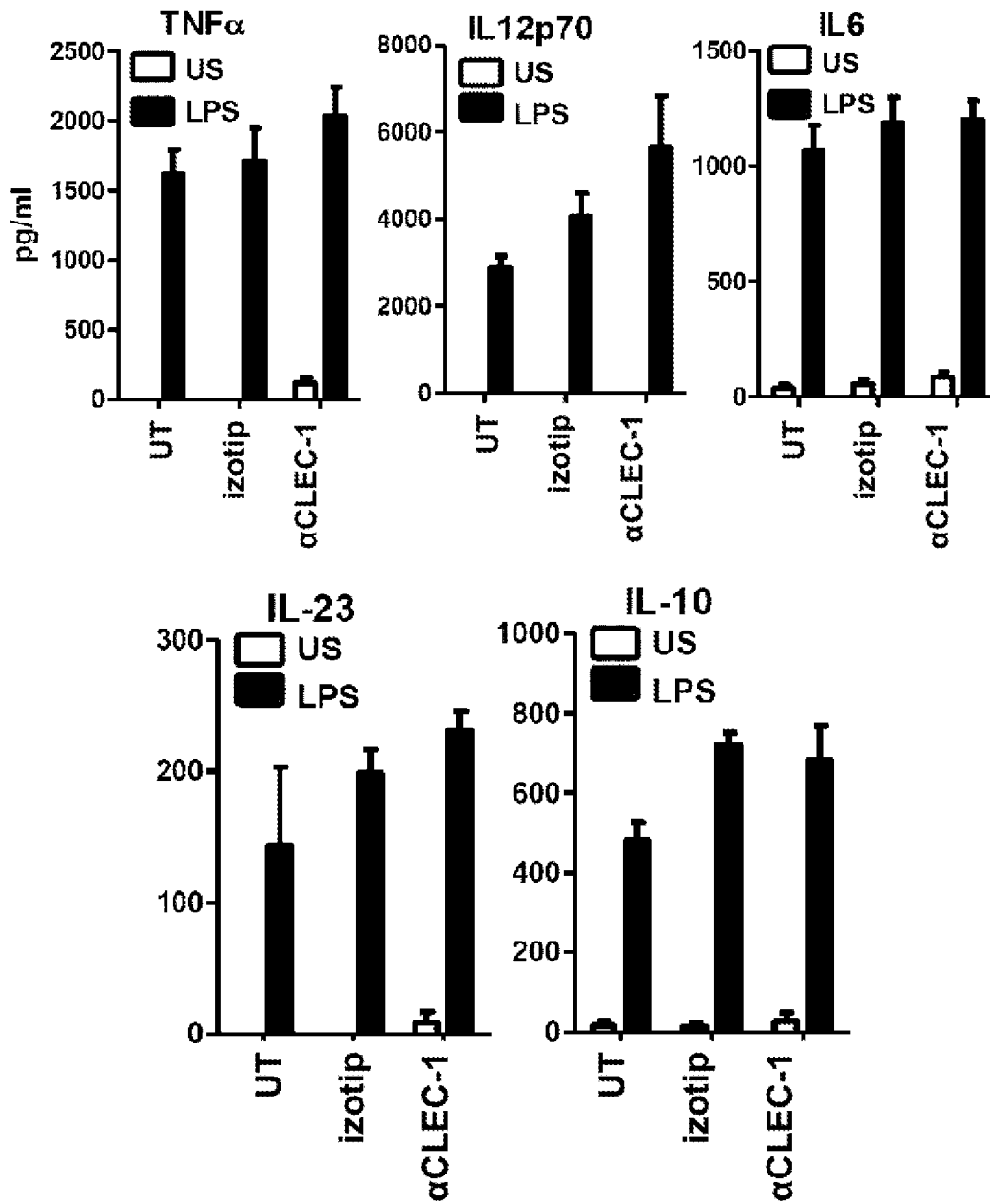


Figura 2B

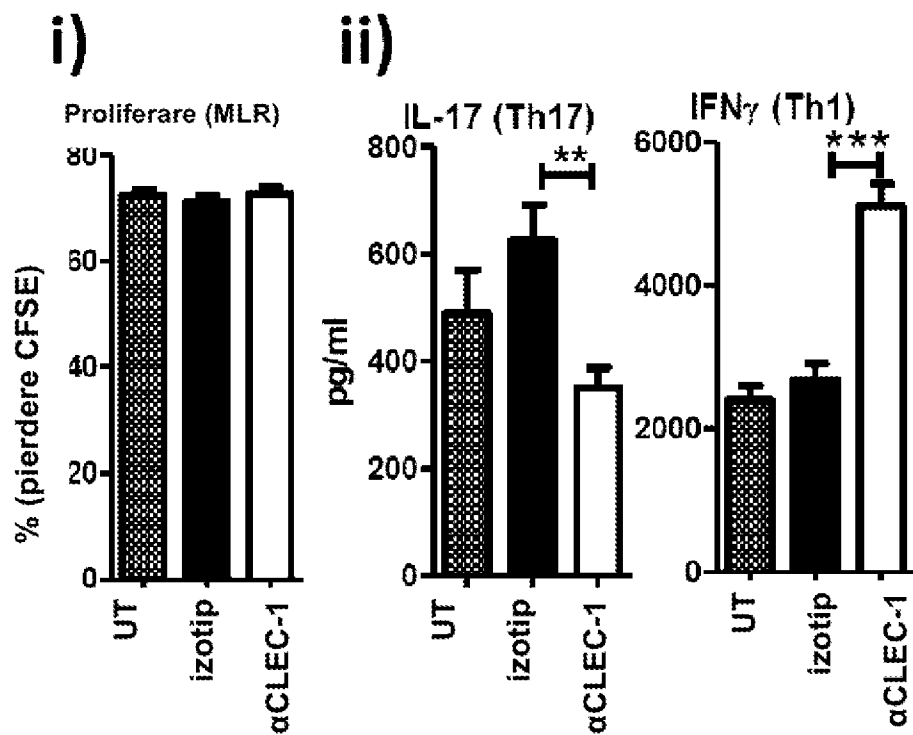


Figura 2C

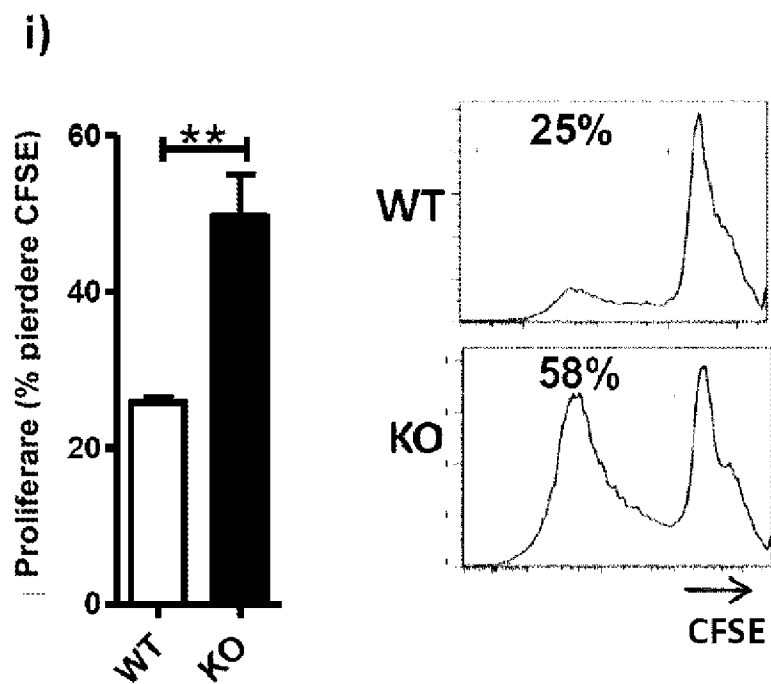


Figura 3

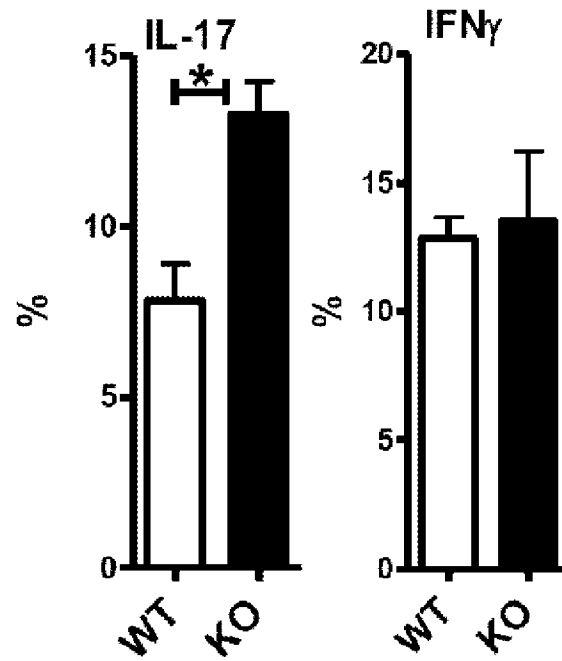
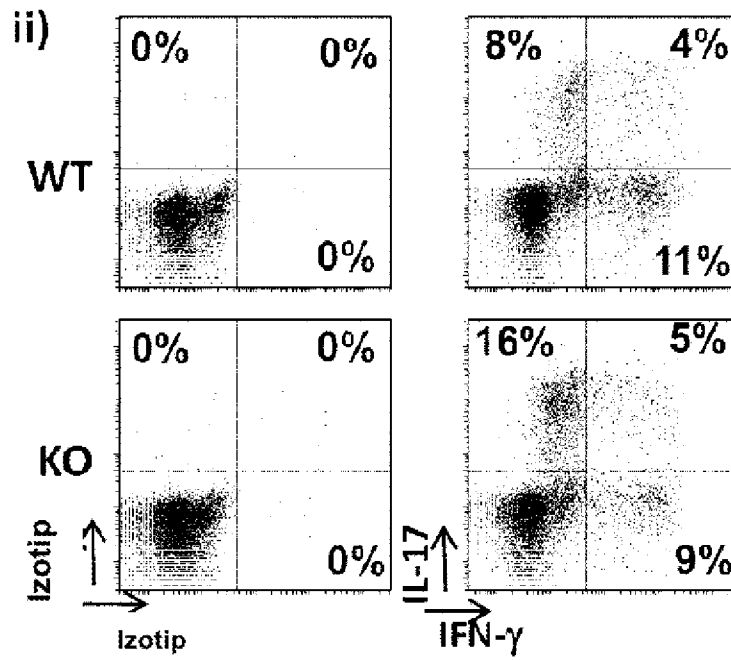


Figura 3 (partea a doua)

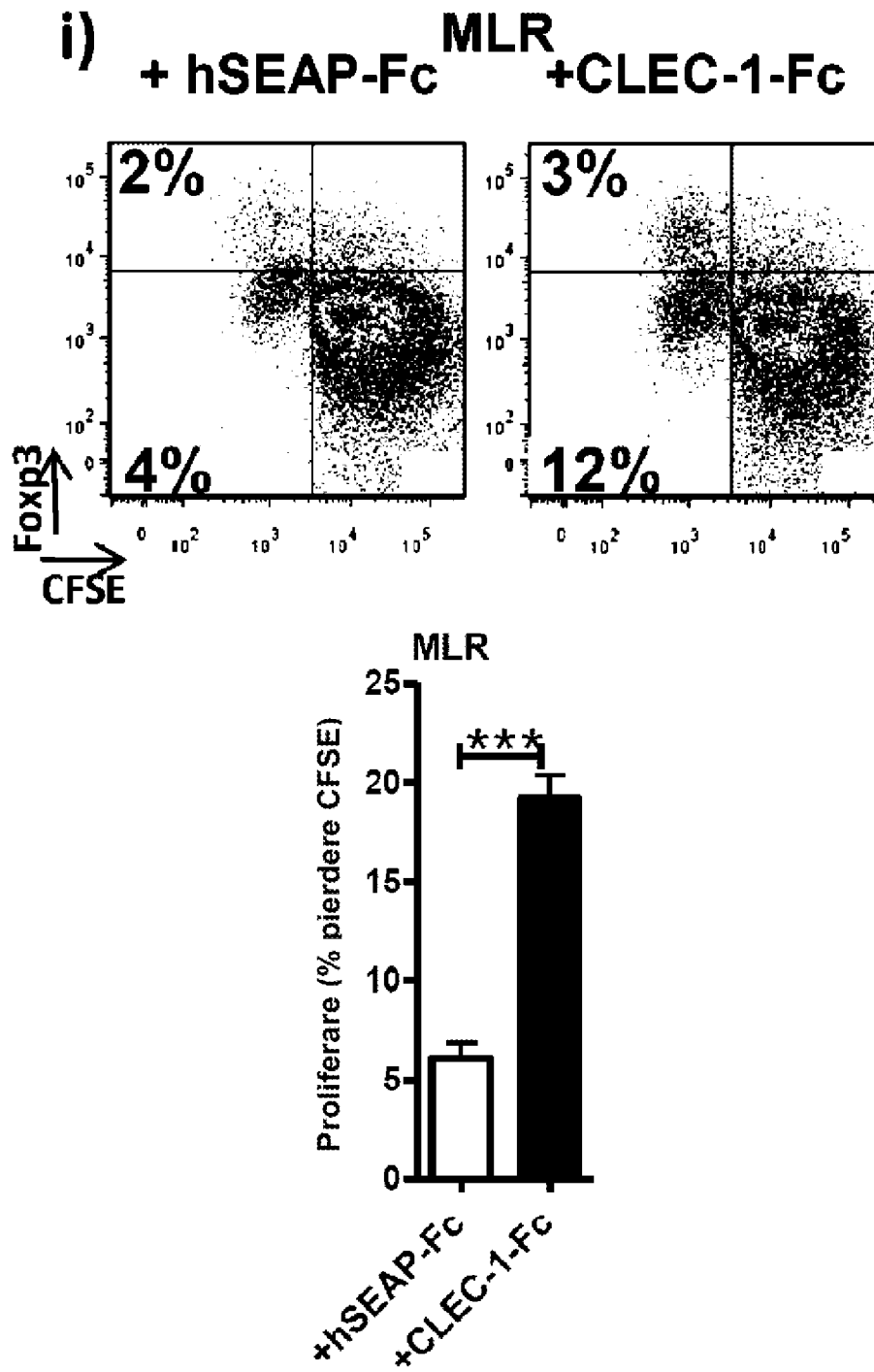


Figura 4

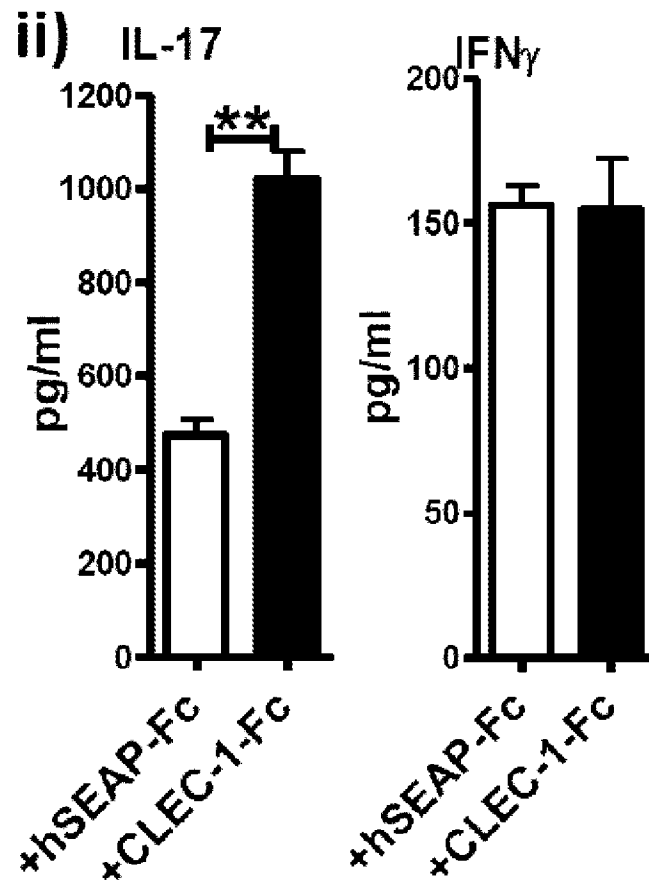


Figura 4 (partea a doua)

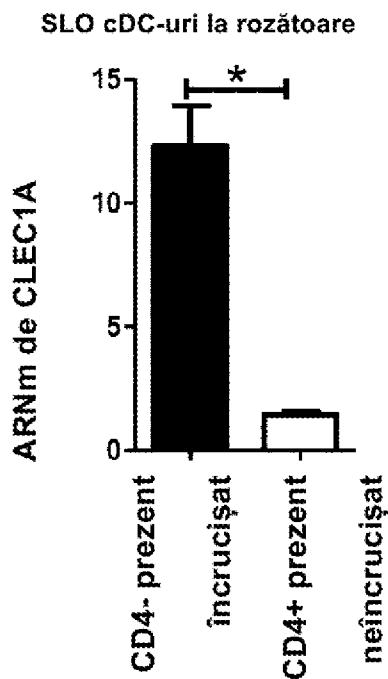


Figura 5A

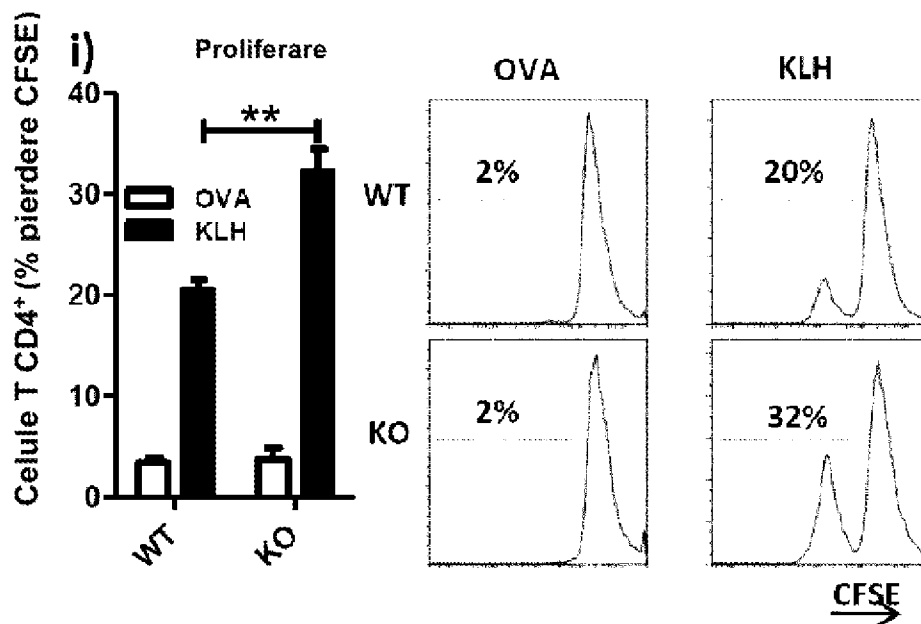


Figura 5B

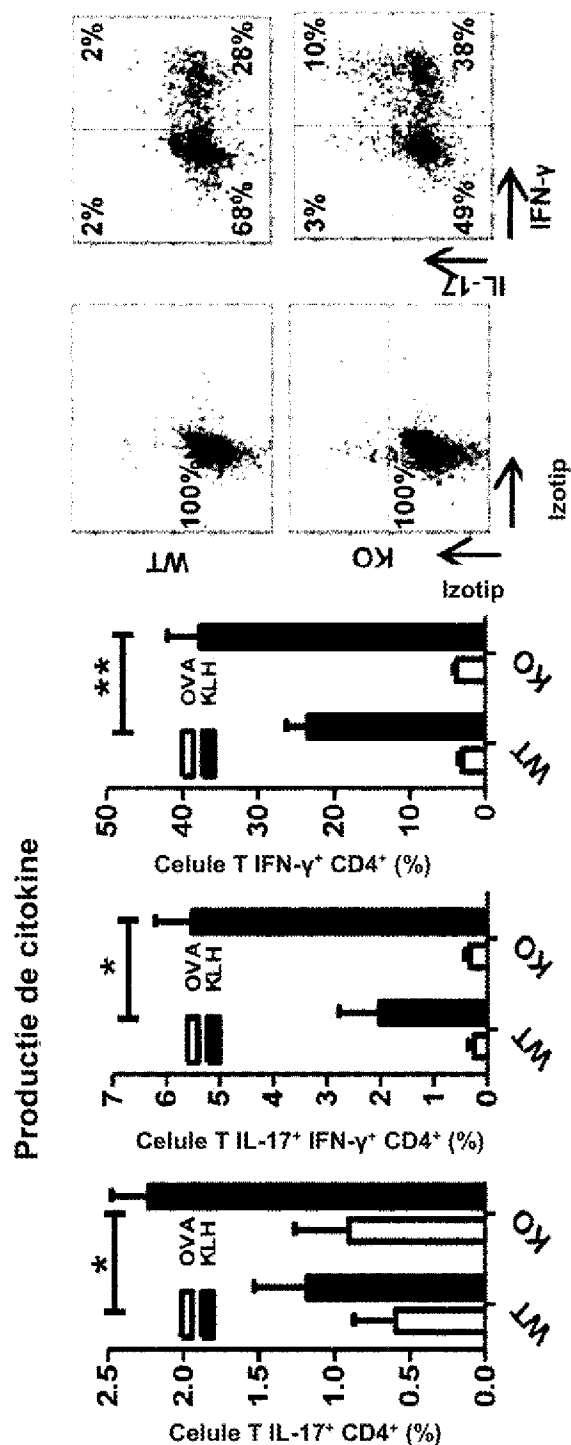


Figura 5B (partea a doua)

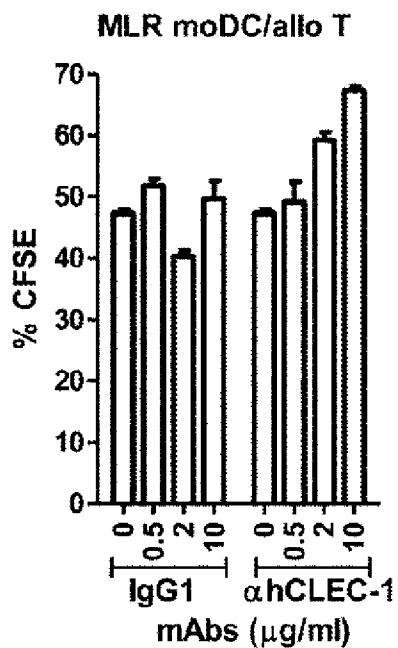


Figura 6A (partea 1/2)

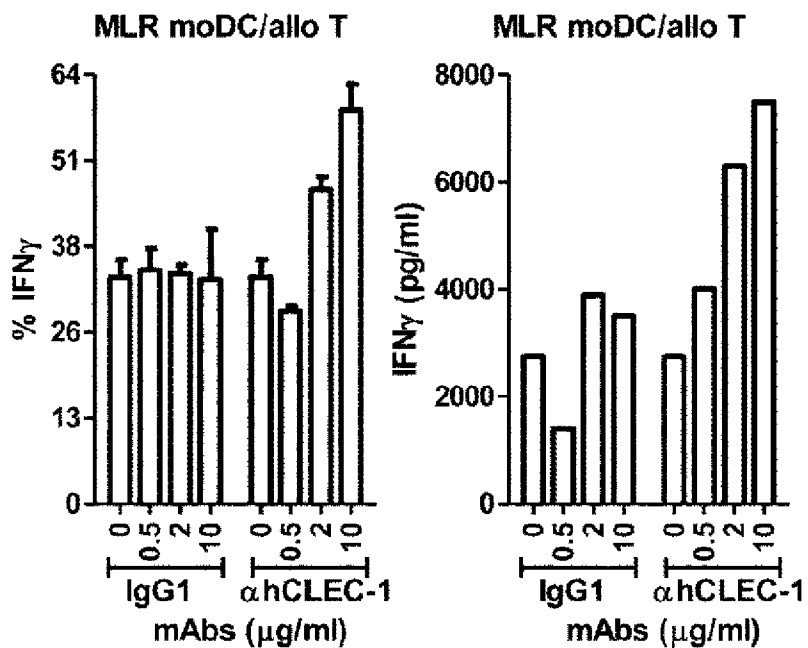


Figura 6A (partea 2/2)

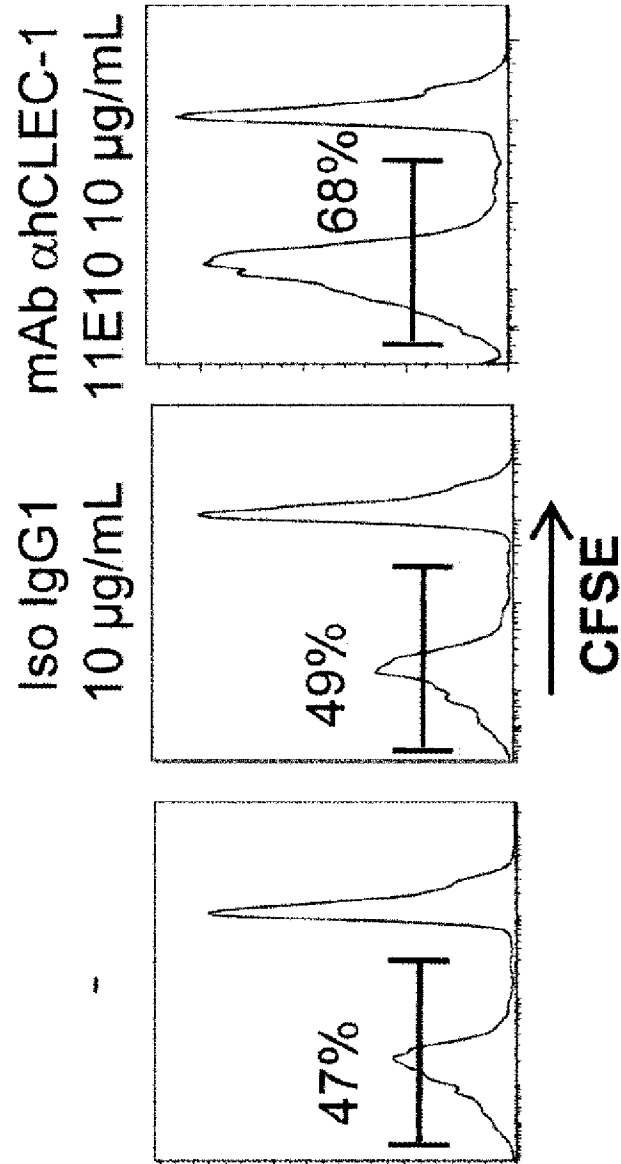


Figura 6B

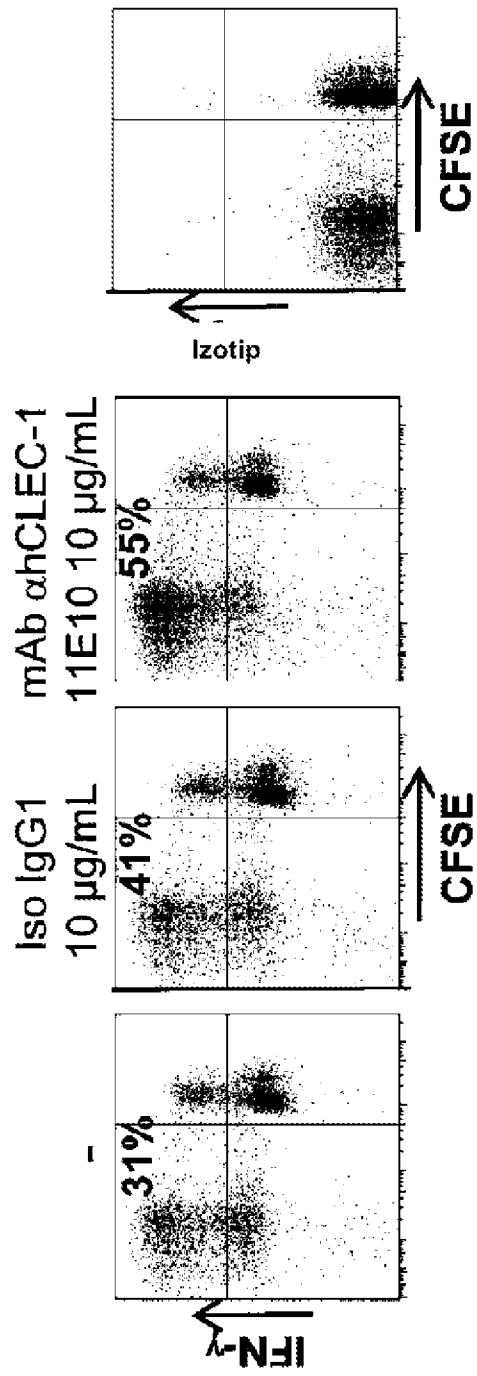


Figura 6C

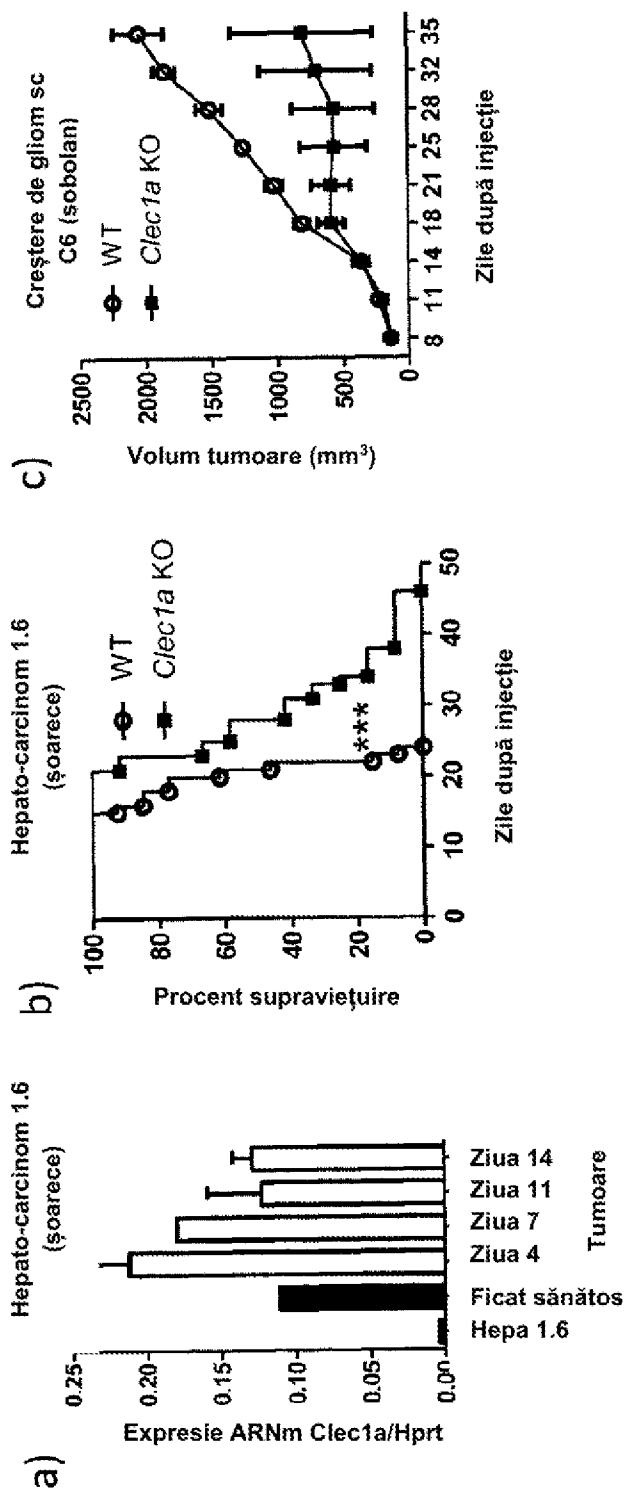


Figura 7

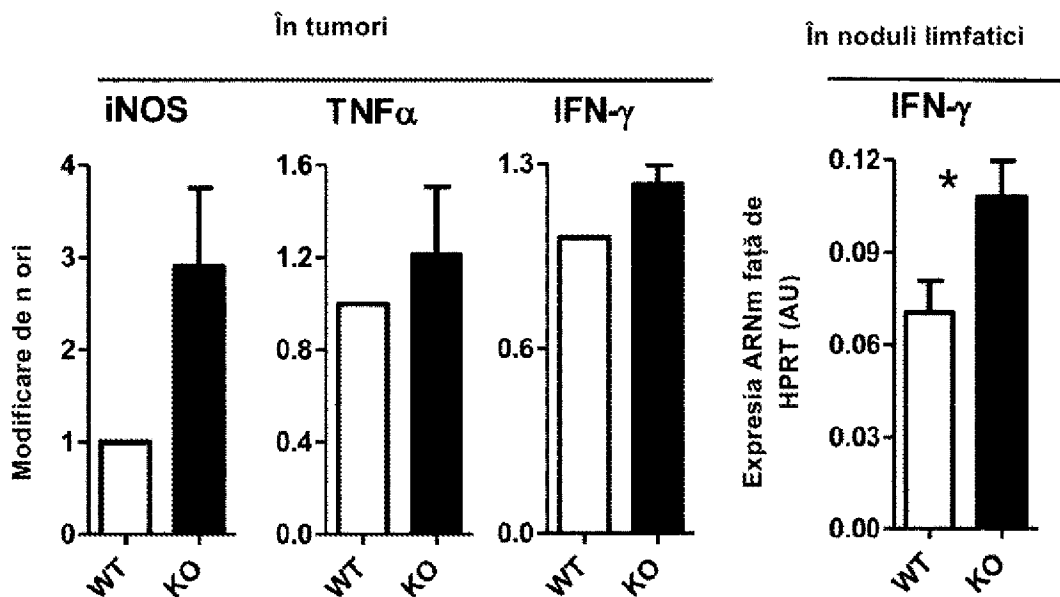
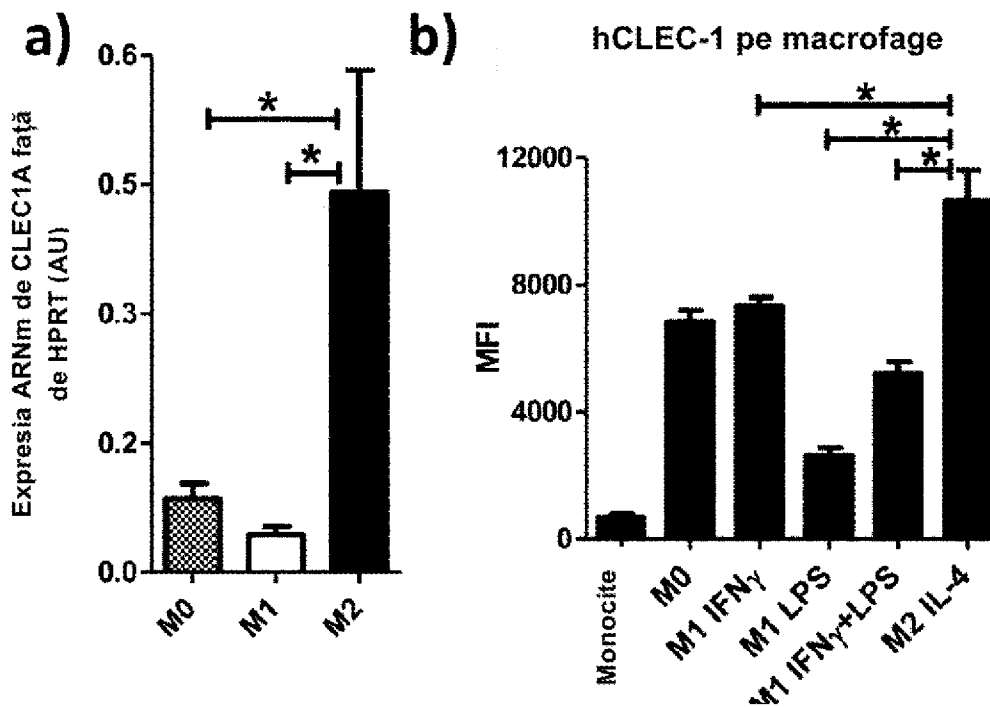


Figura 7d



Figurile 8A & 8B

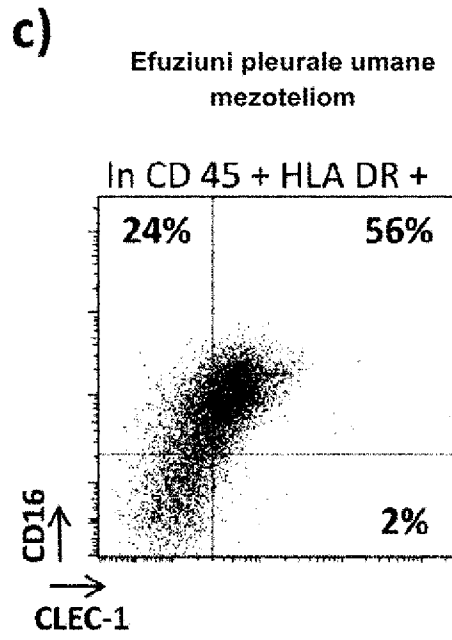


Figura 8c

d) Ascită tumoare ovariană umană

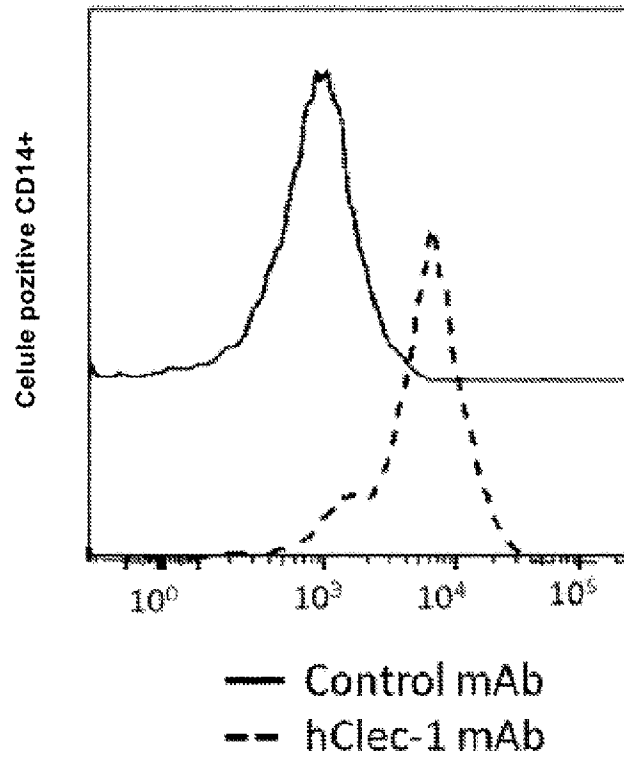


Figura 8D