

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035033**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.04.20**

**(21)** Номер заявки  
**201390756**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2011.11.22**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕДРАКОВОГО ИЛИ  
ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЙ**

---

**(31)** 61/415,973

**(32)** 2010.11.22

**(33)** US

**(43)** 2014.11.28

**(86)** PCT/US2011/061840

**(87)** WO 2012/071411 2012.05.31

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ИННЕЙТ ФАРМА СА (FR)**

**(72)** Изобретатель:  
**Андре Паскаль, Бюффе Рено,  
Розенсвейг Марсель, Тиоллье Жером  
(FR)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** US-A1-20090196850  
US-A1-20100189723  
US-A1-20060194952  
US-A1-20090075340  
WEISS et al., A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. Blood. 20 February 2009, Vol 113(22), pages 5418-5422; pg 5420, col 1, para 2; Fig 2; pg 5418, col 1, para 1  
US-A1-20080317708

---

**(57)** Обеспечен способ лечения гематологического предракового или гематологического ракового заболевания, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющих последовательности CDR антитела 1-7F9.

---

**B1**

**035033**

**035033**

**B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Эта заявка заявляет приоритет предварительной заявки с порядковым номером 61/415973, поданной 22 ноября 2010 г., описание которой, в том числе информация всех последовательностей, включено здесь посредством ссылок.

### Область техники, к которой относится данное изобретение

Это изобретение относится к модуляции активности НК-клеток для лечения гематологических злокачественных заболеваний.

### Область техники этого изобретения

Природные клетки-киллеры (НК-клетки) являются субпопуляцией больших гранулярных лимфоцитов, которые действуют в качестве цитотоксических иммунных клеток. Цитотоксическая активность, опосредуемая НК-клетками в природе против клеток-мишеней (например, раковых клеток, инфицированных вирусами клеток), обычно выражается как результат "баланса" положительных и отрицательных сигналов, передаваемых соответственно активирующими и ингибирующими рецепторами клеточной поверхности.

НК-клетки могут быть идентифицированы любой серией известных маркеров клеточной поверхности, которые варьируются между видами (например, в случае человека часто используются CD56, CD16, NKp44, NKp46 и NKp30; в случае мышей часто используются NK1.1, Ly49A-W, CD49b). В активном состоянии НК-клетки способны убивать определенные аутологичные, аллогенные и даже ксеногенные опухолевые клетки, инфицированные вирусом клетки, некоторые бактерии (например, *Salmonella typhi*) и другие клетки-мишени. НК-клетки, по-видимому, убивают клетки-молекулы, которые экспрессируют мало молекул Главного Комплекса Гистосовместимости Класса I ("MHC-I" или "MHC-I") на их поверхности. НК-клетки убивают также клетки-мишени, к которым прикреплены молекулы антител, посредством механизма, известного как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC). В действии против клеток-мишеней, НК-клетки могут высвобождать образующие поры белки, называемые перфорины, протеолитические ферменты, называемые гранзимами, и цитокины/хемокины (например, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и т.д.), которые приводят непосредственно к апоптозу или лизису клетки-мишени или которые регулируют другие иммунные реакции. После активации, НК-клетки могут также экспрессировать Fas-лиганд (FasL), позволяя этим клеткам индуцировать апоптоз в клетках, которые экспрессируют Fas.

Как достаточная активность НК-клеток, так и количество НК-клеток, обычно являются необходимыми для установления адекватной опосредованной НК-клетками иммунной реакции. НК-клетки могут присутствовать в нормальных количествах в индивидууме, но без активации эти клетки будут неэффективными в выполнении функций жизнеспособной иммунной системы, таких как элиминирование дефектных клеток. Уменьшенная активность НК-клеток связана с развитием и прогрессированием многих заболеваний. Например, исследование продемонстрировало, что низкая активность НК-клеток вызывает более высокую чувствительность к таким заболеваниям, как синдром хронической усталости (CFS), вирусные инфекции и развитие раковых заболеваний.

Активность НК-клеток регулируется модулирующими активностью НК-клеток рецепторами ("NKCAMR" или просто "AMR"), которые могут быть специфическими в отношении различных лигандов, таких как молекулы MHC-I, гомологи MHC-I или другие биологические молекулы, экспрессируемые на клетках-мишенях. НК-клетки в индивидууме обычно представляют ряд активирующих и ингибирующих рецепторов. Активность НК-клеток регулируется балансом сигналов, трансдуцируемых через эти активирующие и ингибирующие рецепторы. Каждый тип NKCAMR обсуждается в свою очередь вкратце ниже. Большинство NKCAMR принадлежат, по-видимому, к одному из двух классов белков: суперсемейству иммуноглобулин (Ig)-подобных рецепторов (IgSF) или суперсемейству C-типа лектин-подобных рецепторов (CTLR) (см, например, Radaev and Sun, *Annu. Rev. Biomol. Struct.* 2003 32:93-114). Однако известны и другие формы NKCAMR.

Антитела против NKCAMR, такие как киллерные иммуноглобулин-подобные рецепторы (KIR), были описаны ранее, и в известном уровне техники было сделано некоторое предложение о комбинировании анти-НК рецептор-антител, таких как анти-KIR-антитела, с другими противораковыми агентами. Например, WO2004056392 описывает анти-NKp30- и/или анти-NKp46-антитела, используемые в смеси с интерлейкином-2 (IL-2). WO 2005009465 описывает комбинирование терапевтического антитела (например, Ритуксана) в комбинации с соединением, которое блокирует ингибирующий рецептор или стимулирует активирующий рецептор НК-клетки (например, анти-KIR mAb, такое как mAb DF200 или анти-NKp30-mAb) для усиления эффективности лечения терапевтическими антителами в субъектах-людях (см. также US 20050037002). WO 2008/084106 описывает анти-KIR-препараты, дозы и схемы введения доз. WO 2005079766 также описывает комбинации антител (например, антител против тканевого фактора), в том числе анти-KIR-антител, для применения в противораковых терапиях. WO 2005003168 и WO 2005003172 описывают комбинации ряда анти-KIR-антител с различными агентами, в том числе с IL-2 и IL-21. WO 2005037306 подобным образом описывает IL-21, производные IL-21 и аналоги IL-21 в комбинации с анти-KIR-антителами.

Хотя НК-клетки получили большое внимание в научной литературе в отношении их потенциально-го вклада в противоопухолевые реакции, опосредуемые антителами, которые связывают опухолевые ан-

тигены, немногие исследования были направлены на эффективность siRNA или потенцирование цитотоксичности NK-клеток непосредственно посредством модуляции рецепторов NK-клеток. Терапии с модулирующими NK-клетки соединениями до сих пор рассматривали как потенциально восстанавливающие способность NK-клеток убивать клетки-мишени. Такие терапии не использовались в случае пациентов без запущенного рака, возможно, в связи с данными, показывающими, что иммунологический контроль NK-клеток ухудшается с существенным заболеванием (например, с общей массой злокачественной опухолевой ткани). Например, в случае миеломы, агрессивная множественная миелома развивается параллельно с количественным снижением и функциональным истощением NK-клеток. Количество NK-клеток также снижается и NK-клетки становятся гипочувствительными к стимуляции в пациентах с запущенной множественной миеломой (ММ).

Таким образом, в данной области существует потребность в способах с использованием модуляции NK-клеток для обеспечения улучшенной эффективности в пациентах. Соединения, которые модулируют активность NK-клеток, например анти-+NKCIR-антитела и их фрагменты, могут быть особенно применимыми в лечении рака.

### **Сущность изобретения**

Данное изобретение обеспечивает способы лечения индивидуума, имеющего или ранее имевшего гематологическое раковое заболевание или предраковое состояние. Эти способы предусматривают введение этому индивидууму терапевтически активного количества соединения, которое ингибирует ингибирующий NK-клетки рецептор (NKCIR). Это соединение предпочтительно вводят этому индивидууму во временной точке, когда этот индивидуум имеет минимальное или недетектируемое заболевание. Кроме того, это изобретение рассматривает применение соединения, которое ингибирует NKCIR (Ингибирующий нормальные киллерные клетки рецептор), для приготовления фармацевтической композиции для лечения индивидуума, имеющего или ранее имевшего гематологическое предраковое состояние или гематологическое раковое заболевание, для введения этому индивидууму во временной точке, когда этот индивидуум имеет минимальное или недетектируемое заболевание, причем указанная композиция содержит терапевтически активное количество соединения, которое ингибирует NKCIR (Ингибирующий природные клетки-киллеры рецептор).

В одном варианте осуществления, этот индивидуум имеет гематологическое предраковое состояние. В одном конкретном варианте осуществления, этот индивидуум имеет SMM (тлеющую миелому), MGUS (моноклональную гаммапатию неустановленной значимости) или MDS (миелодиспластический синдром).

В другом варианте осуществления этот индивидуум имеет или имел ранее гематологическое раковое заболевание (гематобластоз) или генетическую мутацию, которая коррелирует с увеличенным риском возникновения гематологического ракового заболевания. В одном конкретном варианте осуществления этот индивидуум имеет или имел ранее лейкоз, лимфому, миелому или лимфоидную злокачественность. В одном предпочтительном варианте осуществления этот индивидуум имеет или имел ранее AML (острый миелоидный лейкоз), ММ (множественную миелому), SMM (тлеющую миелому), CML (хронический миелоидный лейкоз) или CLL (хронический лимфоцитарный лейкоз).

В одном варианте осуществления этот индивидуум лечился первой терапией для гематологического злокачественного заболевания или гематологического предракового заболевания перед введением этого соединения. Эта первая терапия может быть выбрана из терапии химиотерапевтическим агентом, иммуномодулирующим агентом, лучевой терапии, хирургии и антигормонального агента или антиангиогенного агента или комбинации любых из предыдущих агентов. Предпочтительно этот индивидуум испытывал частичную реакцию или полную реакцию на лечение этой первой терапией. В результате этой первой терапии этот индивидуум может находиться в ремиссии, иметь недетектируемое заболевание, быть бессимптомным и/или иметь низкое количество аномальных (дефектных) клеток.

В одном варианте осуществления этим гематологическим раковым заболеванием является лейкоз, а именно острый миелоидный лейкоз (AML). Предпочтительно этот индивидуум находится в ремиссии, является бессимптомным, имеет недетектируемое заболевание и/или имеет низкое количество дефектных клеток, необязательно, после лечения первой терапией. В одном конкретном варианте осуществления этот индивидуум имеет общую массу отягощенности лейкозом ниже приблизительно  $10^9$  клеток и/или менее 50% бластных клеток в костном мозге и/или отсутствие признаков или симптомов лейкоза.

В одном варианте осуществления этой гематологической злокачественностью является миелома, а именно множественная миелома (ММ). Предпочтительно этот индивидуум испытывал частичную или полную реакцию, находится в ремиссии, является бессимптомным, имеет недетектируемое заболевание и/или имеет низкое количество аномальных клеток, необязательно, после лечения первой терапией. В одном конкретном варианте осуществления этот индивидуум испытывал большее, чем 25%-ное снижение в уровне М-белка в сыворотке. Предпочтительно этот индивидуум испытывал большее, чем 50%-ное снижение в уровне М-белка в сыворотке.

В одном варианте осуществления этой гематологической злокачественностью является тлеющая множественная миелома (SMM). Предпочтительно этот индивидуум испытывал частичную или полную реакцию, находится в ремиссии, является бессимптомным, имеет недетектируемое заболевание и/или

имеет низкое количество дефектных клеток, необязательно после лечения первой терапией. В одном конкретном аспекте этого изобретения этот индивидуум имеет 10% или более плазматических клеток в костном мозге, но не удовлетворяет критериям множественной миеломы (ММ). В другом аспекте этого изобретения этот индивидуум имеет М-белок сыворотки  $\leq 3$  г/дл. Еще в одном аспекте этого изобретения этот индивидуум имеет 10% или более плазматических клеток в костном мозге без проявлений повреждений конечного органа (CRAB). В следующем варианте осуществления этот индивидуум имеет белок А сыворотки  $\leq 3$  г/дл, а также имеет 10% или более плазматических клеток в костном мозге, необязательно также без проявлений повреждений конечного органа.

В одном варианте осуществления этим гематологическим раковым заболеванием является бессимптомная моноклональная гаммапатия неизвестной значимости (MGUS). В одном таком варианте осуществления этот индивидуум предпочтительно имеет менее 10% плазматических клеток в костном мозге.

Это изобретение рассматривает также способы, предусматривающие:

(а) определение, имеет ли индивидуум, имеющий или имевший гематологическое злокачественное заболевание, минимальное или недетектируемое заболевание, и

(b) если этот индивидуум имеет минимальное или недетектируемое заболевание, лечение этого индивидуума терапевтически активным количеством соединения, которое ингибирует NKCIK.

Кроме того, это изобретение включает в себя способы, предусматривающие:

(а) определение, имеет ли индивидуум тлеющую множественную миелому (SMM), бессимптомную моноклональную гаммапатию неизвестной значимости или миелодиспластический синдром (MDS); и

(b) если этот индивидуум имеет SMM, MGUS или MDS, лечение этого индивидуума терапевтически активным количеством соединения, которое ингибирует NKCIK.

Кроме того, это изобретение включает в себя способы, предусматривающие:

(а) лечение индивидуума, имеющего гематологическое злокачественное заболевание, первой терапией (например, одной или несколькими индукционными (стартовыми) терапиями и необязательно одной или несколькими консолидационными (объединенными) терапиями), необязательно, где этой первой терапией является химиотерапевтический агент или иммуномодуляторный агент, например Imid, так что этот индивидуум имеет минимальное или недетектируемое заболевание (например, заболевание находится в ремиссии и/или этот индивидуум испытывает реакцию на эту первую терапию);

(b) лечение этого индивидуума, имеющего минимальное или недетектируемое заболевание, терапевтически активным количеством соединения, которое ингибирует NKCIK. Необязательно, стадия (а) предусматривает дополнительно определение, имеет ли индивидуум, имеющий или имевший гематологическое злокачественное состояние, минимальное или недетектируемое заболевание.

Дополнительно это изобретение рассматривает применение соединения в приготовлении композиции, содержащей часть, которая детектирует, имеет ли или имел ли ранее индивидуум гематологическое злокачественное заболевание, минимальное или недетектируемое заболевание, и, если этот индивидуум имеет минимальное или недетектируемое заболевание, лечение этого индивидуума терапевтически активным количеством соединения, которое ингибирует NKCIK.

Это изобретение рассматривает также применение соединения в приготовлении композиции, содержащей часть, которая детектирует, имеет ли индивидуум тлеющую множественную миелому (SMM), бессимптомную моноклональную гаммапатию (MGUS) или миелодиспластический синдром (MDS), и если этот индивидуум имеет SMM, MGUS или MDS, лечение этого индивидуума терапевтически активным количеством соединения, которое ингибирует NKCIK.

Кроме того, это изобретение предусматривает применение соединения в приготовлении композиции для лечения индивидуума, имеющего гематологическое злокачественное заболевание, лечение этого индивидуума первой терапией, так что этот индивидуум с первой терапией имеет минимальное или недетектируемое заболевание, и лечение этого индивидуума, имеющего минимальное или недетектируемое заболевание, терапевтически активным количеством соединения, которое ингибирует NKCIK.

В одном варианте осуществления определение, имеет ли индивидуум, имеющий или имевший гематологическое злокачественное заболевание, минимальное или недетектируемое заболевание, находится в ремиссии, имеет частичную или полную реакцию, и/или имеет конкретную патологию (например, SMM, MGUS, AML, CML, MDS, ММ и т.д.), выполняют в соответствии со стандартными медицинскими руководствами.

В одном варианте осуществления определение, имеет ли индивидуум, имеющий или имевший гематологическое злокачественное состояние, минимальное или недетектируемое заболевание, находится в ремиссии, имеет частичную или полную реакцию, предусматривает идентификацию популяции аномальных (дефектных) клеток или аномальных количеств клеток (например, процента плазматических клеток в костном мозге). Необязательно указанной идентификацией является проточная цитометрия. Необязательно этот способ дополнительно предусматривает сортировку или выделение популяции аномальных клеток.

В одном варианте осуществления определение, имеет ли индивидуум, имеющий или имевший гематологическое злокачественное заболевание, минимальное или недетектируемое заболевание, находится

ся в ремиссии, имеет частичную или полную реакцию, предусматривает детектирование цитогенетических aberrаций (например, оценением кариотипа).

В одном варианте осуществления детектирование минимального заболевания предусматривает сортировку популяции аномальных клеток; и приведение нуклеиновой кислоты, выделенной из подвергнутых сортировке клеток, в контакт с одной или несколькими нуклеиновыми кислотами, нацелены на генетическую реаранжировку, которая коррелирует с увеличенной вероятностью начала гематологического злокачественного заболевания, где это приведение в контакт определяет присутствие цитогенетических aberrаций; детектируя посредством этого присутствие минимального заболевания. В одном варианте осуществления этим генетическим маркером является мутация в FLT3 или NPM1, которая коррелирует с плохим прогнозом в отношении продолжительности выживания в индивидуумах, имеющих AML. В другом варианте осуществления этим генетическим маркером является реаранжировка в гене иммуноглобулина (Ig) и/или гене T-клеточного рецептора.

В одном варианте осуществления определение, имеет ли индивидуум, имеющий или имевший гематологическое злокачественное заболевание, минимальное или недетектируемое заболевание, находится в ремиссии, имеет частичную или полную реакцию (например, в MM), предусматривает оценивание уровней моноклонального белка сыворотки (M-белка) в этом индивидууме.

В одном варианте осуществления определение, имеет ли индивидуум SMM или MGUS, предусматривает оценивание уровней моноклонального белка сыворотки (M-белка) в этом индивидууме, где, необязательно, пациент, который определяется как имеющий SMM, если уровни M-белка равны по меньшей мере 3 г/дл. В одном варианте осуществления определение, имеет ли индивидуум SMM или MGUS, предусматривает оценивание плазматических клеток костного мозга в этом индивидууме; где, необязательно, этот пациент определяется как имеющий SMM, если этот индивидуум имеет по меньшей мере 10% плазматических клеток в костном мозге.

Как обсуждалось выше, пациент имеет плохой прогноз заболевания, например находится при большом риске прогрессирования, на основе одного или нескольких прогностических факторов. В одном варианте осуществления этот пациент имеет SMM и находится в группе 1, в соответствии с классификацией в табл. 2. В другом варианте осуществления этот пациент имеет плохой прогноз на основе мутации генов, например этот пациент имеет AML и мутацию в FLT3 или NPM1, ассоциированную с плохим прогнозом.

В одном варианте осуществления соединение, которое ингибирует NKCIK, используется в качестве единственного агента. В другом варианте осуществления соединение, которое ингибирует NKCIK, вводится в комбинации по меньшей мере с одним другим терапевтическим агентом.

Соединение, которое ингибирует NKCIK, может модулировать цитотоксичность NK-клеток в результате ингибирования указанного NKCIK. Предпочтительно соединением, которое ингибирует NKCIK, является анти-NKCIK-антитело или фрагмент антитела, имеющий способность блокирования или нейтрализации NKCIK-опосредованных NK и посредством этого потенцирования активности NK-клеток против блокированных в противном случае клеток-мишеней. В одном варианте осуществления этим антителом или фрагментом антитела является антитело против киллерного иммуноглобулин-подобного рецептора ((KIR) или его фрагмента. В другом варианте осуществления этим антителом или фрагментом антитела является химерное антитело, антитело человека или гуманизированное антитело или фрагмент антитела. Еще в одном варианте осуществления это антитело или фрагмент антитела содержит IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM. Предпочтительно это антитело или фрагмент антитела содержит IgG1 или IgG4. В одном варианте осуществления это антитело или фрагмент антитела содержит Fc-домен, который содержит по меньшей мере одну мутацию, которая влияет на одну или более эффекторных функций, период полувыведения, протеолиз, связывание FcR или гликозилирование.

В одном конкретном варианте осуществления этим антителом или фрагментом антитела является анти-KIR-антитело или фрагмент антитела, который связывает KIR2DL1 и KIR2DL2/3.

Предпочтительно это анти-KIR-антитело или фрагмент антитела конкурирует с 1-7F9. Более предпочтительно анти-KIR-антителом или фрагментом антитела является 1-7F9 или его фрагмент. Обсуждается также, что фрагментом анти-KIR-антитела является фрагмент 1-7F9, который имеет такие же самые свойства связывания, что и 1-7F9. В одном аспекте это анти-KIR-антитело или фрагмент антитела содержит домены VL и VH, которые по меньшей мере на 90% идентичны этим доменам 1-7F9. В другом аспекте это анти-KIR-антитело или фрагмент антитела содержит домены VL и VH 1-7F9. Еще в одном аспекте VL этого анти-KIR-антитела или фрагмента антитела содержит CDR VL 1-7F9. В дополнительном аспекте VH этого анти-KIR-антитела или фрагмента антитела содержит CDR VH 1-7F9.

В одном варианте осуществления это анти-KIR-антитело или фрагмент антитела содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности с 1-7F9, по меньшей мере 90% идентичность последовательности с 1-7F9, по меньшей мере 95% идентичность последовательности с 1-7F9 или по меньшей мере 98% идентичность последовательности с 1-7F9. В другом варианте осуществления это анти-KIR-антитело или фрагмент антитела специфически связывается с одним и тем же линейным или конформационным эпитопом на интактных KIR2DL1 или KIR2DL2/3, как и 1-7F9, и/или конкурирует с 1-7F9 за связывание с одним и тем же линей-

ным или конформационным эпитопом на интактных KIR2DL1 или KIR2DL2/3.

В другом варианте осуществления этим антителом или фрагментом антитела является антитело против NKСIR, выбранных из группы, состоящей из CD94, NKG2 (например, NKG2A и NKG2E) и LIR (например, LILRB1-B5), или их фрагмента.

В одном варианте осуществления этого изобретения это анти-NKСIR-антитело вводят в виде фармацевтически приемлемой композиции, содержащей терапевтически эффективное количество анти-NKСIR-антитела. В одном аспекте это NKСIR-антитело вводят в количестве, приводящем, по существу, к полному насыщению NKСIR на NK-клетках в течение периода по меньшей мере приблизительно 1 недели, по меньшей мере приблизительно 2 недель или по меньшей мере приблизительно одного месяца.

В одном аспекте антитело вводят в дозах в количестве и при частоте, которые приводят, по существу, к полному насыщению NKСIR на NK-клетках в течение периода по меньшей мере приблизительно 1 недели, по меньшей мере приблизительно 2 недель или по меньшей мере приблизительно одного месяца без значимой "десатурации" во время этого периода лечения. В одном варианте осуществления терапевтически активным количеством одного или нескольких NKСIR-антител является количество такого антитела, которое приводит, по существу, к полному насыщению NKСIR на NK-клетках в течение периода по меньшей мере приблизительно 1 недели, по меньшей мере приблизительно 2 недель или по меньшей мере приблизительно одного месяца после введения этого антитела, где это антитело вводят несколько раз при частоте введения доз один раз приблизительно каждые 2 недели, один раз приблизительно каждый месяц или один раз приблизительно каждые 2 месяца или более, и последующие дозы разделяют приблизительно 2 неделями или приблизительно 1 месяцем.

В одном аспекте антитело дозируют в количестве и при частоте, которые приводят, по существу, к полному насыщению NKСIR на NK-клетках в течение периода по меньшей мере приблизительно 1 недели, по меньшей мере приблизительно 2 недель или по меньшей мере приблизительно одного месяца и которая делает возможной значимую "десатурацию" во время этого периода лечения. В одном варианте осуществления, терапевтически активным количеством одного или нескольких NKСIR-антител является количество такого антитела, которое приводит по существу к полному насыщению NKСIR на NK-клетках в течение периода по меньшей мере приблизительно 1 недели, по меньшей мере приблизительно 2 недель или по меньшей мере приблизительно одного месяца после введения этого антитела, где это антитело вводят несколько раз при частоте введения доз один раз приблизительно каждые 2 недели, один раз приблизительно каждый месяц или один раз приблизительно каждые 2 месяца и последующие дозы разделяют приблизительно 2 неделями или приблизительно 1 месяцем.

В другом варианте осуществления это анти-NKСIR-антитело или фрагмент антитела вводят в диапазоне доз приблизительно 0,1 - приблизительно 3,0 мг/кг, приблизительно 0,3 - приблизительно 3,0 мг/кг, приблизительно 0,1 - приблизительно 1,0 мг/кг или приблизительно 1,0 - приблизительно 3,0 мг/кг. Предпочтительно анти-NKСIR-антитело или фрагмент антитела вводят приблизительно один раз каждые 2 месяца.

В другом аспекте любой из различных вышеописанных способов может быть, необязательно, модифицирован применением лечения с использованием химиотерапии с одним или несколькими дополнительными противораковыми агентами, например химиотерапевтическими агентами.

В другом варианте осуществления обеспечены фармацевтические композиции для терапии человека, которые содержат анти-NKСIR-антитело или фрагмент антитела в соответствии с этим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент, которые после введения среднему субъекту-человеку (приблизительно 45-90 кг по массе) приводят к диапазону доз приблизительно 0,1 - приблизительно 3,0 мг/кг, приблизительно 0,3 - приблизительно 3,0 мг/кг, приблизительно 0,1 - приблизительно 1,0 мг/кг или приблизительно 1,0 - приблизительно 3,0 мг/кг. В конкретных вариантах, композиция после введения среднему субъекту-человеку приводит к диапазону доз приблизительно 0,1-0,3 мг/кг и более конкретно 0,2 или приблизительно 0,3 мг/кг.

Это изобретение рассматривает также способы для лечения индивидуума, имеющего заболевание, и/или потенцирования активности NK-клеток в индивидууме, нуждающемся в этом. Этот способ предусматривает введение этому индивидууму анти-NKСIR-антитела или фрагмента антитела в количестве, которое обеспечивает дозу приблизительно 0,1 мг/кг - приблизительно 0,3 мг/кг в пациенте-человеке, и фармацевтически приемлемый носитель, где это анти-NKСIR-антитело или фрагмент антитела вводят не более, чем один раз в месяц. Дополнительно, это изобретение рассматривает применение анти-NKСIR-антитела или фрагмента антитела в количестве, которое обеспечивает дозу приблизительно 0,1 мг/кг - приблизительно 0,3 мг/кг в пациенте-человеке, и фармацевтически приемлемый носитель для приготовления фармацевтической композиции для лечения человека. В одном варианте осуществления, это анти-NKСIR-антитело или фрагмент антитела вводят не более чем один раз каждые два месяца. В другом варианте осуществления, это анти-NKСIR-антитело или фрагмент антитела вводят один раз в месяц - один раз каждые два месяца. Еще в одном варианте осуществления, это анти-NKСIR-антитело или фрагмент антитела обеспечивают в дозе приблизительно 0,1 мг/кг - приблизительно 0,2 мг/кг в пациенте-человеке.

Эти аспекты более полно описаны ниже, и дополнительные аспекты, признаки и преимущества этого изобретения будут очевидными из описания обеспеченного здесь изобретения.

### Описание фигур

Фиг. 1 показывает терапевтическую стратегию для большинства пациентов с AML, которая разделена на две основные фазы - индукционная (стартовая) терапия и терапия после ремиссии.

Фиг. 2 (фиг. 12 WO 2006/003179) обеспечивает сравнительное сопоставление аминокислотных последовательностей переменных областей легкой цепи и CDR легкой цепи антител DF200 и Pan2D (NKVSF1). (A) Сопоставление анти-KIR-переменных областей легкой цепи (VL) DF200 (SEQ ID NO: 1) и Pan-2D (SEQ ID NO: 2). Номера вышеуказанных аминокислотных последовательностей указывают положение, соответствующее инициации трансляции Met (+1) в незрелом (несекретируемом) иммуноглобулине. (B)

Сопоставление CDR-L1 последовательностей. Остатки до: обычно Cys. Остатки после: Trp. Обычно Trp-Tyr-Leu. Длина: 10-17 аминокислот (aa). (C) Сопоставление CDR-L2 последовательностей. Остатки до: Обычно Ile-Tyr. Длина: 7 аминокислот (aa). Старт: приблизительно 16 аминокислот (aa) после конца CDR-L1. Старт: приблизительно 24 аминокислоты (aa) от начала секретируемого белка. (D) Сопоставление CDR-L3 последовательностей. Остатки до: Cys. Остатки после: Phe-Gly-XXX-Gly. Длина: 7-11 аминокислот (aa). Старт: приблизительно 33 аминокислоты (aa) после конца CDR-L2.

Фиг. 3 (фиг. 13 WO 2006/003179) обеспечивает переменную область тяжелой цепи и CDR тяжелой цепи антитела DF200. (A) VH-область DF-200, незрелый белок. Секретируемый зрелый VH начинается в положении 20: остаток Q. VH-область заканчивается остатком S и после этого константная область (не показано) продолжается. (B) CDR-H1. Остатки до: Cys-XXX-XXX-XXX. Остатки после: Trp. Обычно Trp-Val или Trp-Ile. Длина: 10-14 аминокислот (aa). Старт: приблизительно 22-26 аминокислоты (aa) от начала этого секретируемого белка. (C) CDR-H2. Остатки до: Leu-Glu-Trp-Ile-Gly, но возможны другие вариации. Остатки после: Lys или Arg/Leu или Ile или Val или Phe или Thr или Ala/Thr или Ser или Ile или Ala. Длина: 16-20 аминокислот (aa). Старт: Приблизительно 15 аминокислот (aa) после конца CDR-H1. (D) CDR-H3. Остатки до: Cys-XXX-XXX (Обычно Cys-Ala-Arg). Остатки после: Trp-Gly-XXXvGly. Длина: 3-25 аминокислот (aa). Старт: Приблизительно 33 аминокислоты (aa) после конца CDR-H2.

Фиг. 4 (фиг. 14 WO 2006/003179) изображает нуклеотидные и аминокислотные последовательности VH- и VL-последовательности антитела человека 1-7F9. (A) Трансляция зрелой переменной легкой цепи HuKIR 1-7F9. (B) Нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелую переменную легкую цепь HuKIR 1-7F9. (C) Трансляция зрелой переменной тяжелой цепи HuKIR 1-7F9. (D) Нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелую тяжелую цепь HuKIR 1-7F9.

Фиг. 5 (фиг. 1 WO 2006/003179) показывает аминокислотные последовательности VH- и VL-последовательностей моноклональных антител 1-7F9, DF200 (VH-последовательность: SEQ ID NO: 19; VL-последовательность: SEQ ID NO: 21) и Pan2D (NKVSF1; VH-последовательность: SEQ ID NO: 20; VL-последовательность: SEQ ID NO: 22). CDR находятся в боксах.

Фиг. 6 (фиг. 20 WO 2006/003179) показывает связывающий эпитоп 1-7F9 на KIR2DL1, как показано в последовательности KIR2DL1. Аминокислоты в пределах расстояния 4,0 ангстрем от 1-7F9 выделены серым и черным фоном. Аминокислоты, выделенные черным фоном, участвуют в образовании водородной связи с 1-7F9. SEQ ID NO., перечисленные на фиг. 2-6, соответствуют SEQ ID NO: в Списке последовательностей, поданном в WO2006/003179, который содержится на страницах, предшествующих формуле изобретения этой заявки.

### Описание изобретения

Это изобретение обеспечивает способы лечения индивидуума, имеющего или имевшего ранее гематологическое злокачественное заболевание или предраковое состояние. Эти способы предусматривают введение этому индивидууму терапевтически активного количества соединения, которое ингибирует ингибирующий NK-клетки рецептор (NKCIR). Это соединение вводят этому индивидууму во временной точке, когда этот индивидуум имеет минимальное или недетектируемое заболевание.

Описанные здесь клинические исследования на человеке показали, что лечение соединением, которое блокирует ингибирующий NK-клетки рецептор, участвующий в цитотоксичности NK-клеток, например, анти-KIR-антителами, в сильной степени пролонгировали выживаемость без заболевания в пациентах, которые страдали от гематологического злокачественного заболевания, но находились в ремиссии и/или имели минимальное или недетектируемое заболевание, при лечении этим соединением.

### Антитела

Если не указано другое или нет явного противоречия с контекстом, термин антитело в контексте этого изобретения относится к молекуле иммуноглобулина (Ig), фрагменту молекулы Ig или их любому производному, которые имеют способность: (a) специфически связываться по меньшей мере с одним антигеном-мишенью при типичных физиологических условиях в течение существенных периодов времени и/или (b) модулировать физиологическую реакцию, ассоциированную с его NKCIR-мишенью, например модулировать KIR-модулируемую активность NK-клеток. Существенный период времени в этом отношении означает любой период, подходящий для детектирования комплекса антитело-антиген в стандартном иммунологическом анализе, таком как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Обычно, существенный период времени является периодом по меньшей мере приблизительно 30 мин, по меньшей мере приблизительно 45 мин, по меньшей мере приблизительно 1 ч, по меньшей мере прибли-

зительно 2 ч, по меньшей мере приблизительно 4 ч, по меньшей мере приблизительно 8 ч, по меньшей мере приблизительно 12 ч, приблизительно 24 ч или более, приблизительно 48 ч или более, и т.д.

Иммуноглобулины являются классом структурно родственных белков, содержащих тяжелые цепи (например, цепи  $\alpha$ ,  $\Delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ ) и легкие цепи (например, цепи  $\kappa$  и  $\lambda$ ). В человеке, иммуноглобулины могут быть разделены на пять основных классов (IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) в соответствии с тем, какие тяжелые цепи содержатся в этой молекуле Ig.

Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована. См., например, *Fundamental Immunology* (Paul W., ed., 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Молекулы IgG, наиболее обычный тип иммуноглобулина, содержат две пары полипептидных цепей, одну пару легких (L), низкомолекулярных цепей и одну пару тяжелых (H) цепей, все четыре из которых связаны между собой дисульфидными связями. Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из варибельной области тяжелой цепи (сокращаемой здесь как HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи. Эта константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь обычно состоит из варибельной области легкой цепи (сокращаемой здесь как LCVR или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена, CL. Эти области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными в последовательности и/или форме структурно определяемых петель), также называемые определяющими комплементарность областями (CDR), разбросанными между областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). В полноразмерных, природно продуцируемых антителах, каждый VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (которые могут также называться FR L1, CDR L1 и т.д. или петля L1, L2, L3 в варибельном домене легкой цепи и петля H1, H2 и H3 в домене тяжелой цепи в случае гипервариабельных областей петель (см., например, Chothia and Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Обычно, нумерацию аминокислотных остатков в этой области выполняют способом, описанным в Rabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (фразы, такие как "нумерация остатков варибельного домена по Кабату" и "в соответствии с Кабатом", относятся здесь к этой системе нумерации для варибельных доменов тяжелой цепи или варибельных областей тяжелой цепи). С использованием этой системы нумерации, фактическая линейная аминокислотная последовательность пептида может содержать меньше аминокислот или содержать дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению или inserтированию в нее, FR или CDR варибельного домена. Например, варибельная область тяжелой цепи может включать в себя единственный аминокислотный инсерт (вставку) (остаток 52a согласно Кабату) после остатка 52 CDR H2 и inserтированные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c, и т.д. согласно Кабату) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Кабату может быть определена для конкретного антитела сопоставлением в областях гомологии последовательности этого антитела со "стандартной" пронумерованной по Кабату последовательностью.

Как указано выше, анти-NKCIR-антитело может находиться в форме "фрагмента" антитела (или содержать фрагмент антитела), который сохраняет способность специфически связываться с NKCIR. Такие фрагменты антител могут быть охарактеризованы сохранением любого вышеупомянутого признака или комбинации вышеупомянутых признаков, ассоциированных с полноразмерными, обсуждаемыми здесь в другом месте, до приемлемой степени (например, многие фрагменты антител лишены Fc-домена и, соответственно, не индуцируют или не стимулируют ассоциированные с антителом функции комплемента). Антигенсвязывающая функция антител может выполняться любым количеством их подходящих фрагментов. Примеры фрагментов антител включают в себя: (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий, по существу, из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагменты F(ab)<sub>2</sub> и F(ab')<sub>2</sub>, бивалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий, по существу, из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий, по существу, из доменов VL и VH одного плеча антитела; (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546), который состоит по существу из домена VH; и (vi) выделенный определяющую комплементарность область (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются различными генами, они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов синтетическим линкером, который позволяет изготовить их в виде единой цепи белка, в которой области VL и VH спариваются в форме моновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; и Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также включены в такие термины, как фрагмент антитела и антитело-подобный пептид/антитело-подобная молекула, если не оговорено особо или не указано ясно контекстом. Предполагается, что другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также включены с эти термины. Диатела являются бивалентными, биспецифическими антителами, в которых домены VH и VL экспрессируются на единой полипептидной цепи, но с использованием линкера, который обычно является слишком коротким для возможности спаривания между этими двумя доменами на одной и той же цепи, что заставляет эти домены спариваться с комплементарными доменами другой це-

пи и создавать два антигенсвязывающих сайта (см., например, Holliger, P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak R. J. et al. (1994) Structure 2: 1121-1123 и Cao et al. (1998), Bioconjugate Chem. 9, 635-644). Хотя такие фрагменты антител имеют сходные свойства связывания с полноразмерными антителами, такие фрагменты антител вместе или независимо друг от друга являются уникальными признаками этого изобретения, проявляющими отличающиеся биологические и/или физико-химические свойства и преимущества, чем свойства антител. Эти и другие полезные фрагменты антител и антитело-подобные молекулы, обеспеченные этим изобретением, обсуждаются дополнительно здесь. В общем, должно быть понятно, что любой подходящий фрагмент антитела может быть использован в качестве заменителя антитела в композициях и способах этого изобретения, описанных здесь, и *visa versa*, если нет другого указания, или это не противоречит явно контексту.

В общем смысле, термин антитело включает в себя поликлональные антитела и моноклональные антитела (mAb). Термин "моноклональное антитело" относится к композиции, содержащей гомогенную популяцию антител, имеющих однородную структуру и специфичность. Поликлональные антитела обычно произведены из сыворотки животного, которое было иммуногенно стимулировано, но они могут быть произведены также рекомбинантной технологией. Анти-KIR-антитела могут рассматриваться как моноклональные антитела, независимо от способа, которым они получены.

Генерированное антитело может иметь любой изотип, и это антитело может иметь переключенный изотип после использования общепринятых способов, которые хорошо известны в данной области. Такие способы включают в себя применение прямых рекомбинантных способов (см., например, Патент США 4816397), способами слияния клетка-клетка (см., например, Патент США 5916771) и других подходящих способов, известных в данной области. Таким образом, эффекторная функция мультиспецифических мультивалентных антител, обеспечиваемых этим изобретением, может быть "изменена" относительно изотипа одного или обоих исходных антител переключением изотипа, например, на антитело IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM для различных терапевтических применений.

#### **Модулирующие активность NK-клеток рецепторы (NKCAMRS)**

Активность NK-клеток регулируется модулирующими активность NK-клеток рецепторами ("NKCAMR" или просто "AMR"), которые могут быть специфическими в отношении различных лигандов, таких как молекулы MHC-I, гомологи MHC-I или другие биологические молекулы, экспрессируемые на клетках-мишенях. NK-клетки в индивидууме обычно представляют ряд активирующих и ингибирующих рецепторов. Активность NK-клеток регулируется балансом сигналов, трансдуцируемых через эти активирующие и ингибирующие рецепторы. Каждый тип NKCAMR обсуждается в свою очередь кратко ниже.

Когда соматические клетки подвергаются стрессу, такому как прогрессирование рака или инфицирование, различные молекулы, такие как MICA и MICB, обычно отображаются на поверхности подвергнутых стрессу клеток и обычно отображенные молекулы MHC-I "теряются" из клеточной поверхности (уменьшаются в количестве и/или гликозилируются таким образом, что они становятся "невидимыми" в качестве "чужеродных" для иммунной системы). NKCAMR являются чувствительными к этим и другим изменениям в потенциальных NK-клетках-мишенях, ассоциированных с клеточным стрессом, заболеванием и нарушением.

Большинство NKCAMR принадлежат, по-видимому, к одному из двух классов белков: суперсемейству иммуноглобулин (Ig)-подобных рецепторов (IgSF) или суперсемейству C-типа лектин-подобных рецепторов (CTLR) (см, например, Radaev and Sun, Annu. Rev. Biomol. Struct. 2003 32:93-114). Однако известны и другие формы NKCAMR. Структуры ряда NKCAMR были выяснены (Id.). Для лучшей иллюстрации этого изобретения здесь описаны типы хорошо понимаемых NKCAMR, со ссылкой на их конкретные примеры. Однако известны несколько дополнительных NKCAMR, наряду с рецепторами, подробно описанными здесь (см., например, Farag et al., Expert Opin. Biol. Ther. 3(2): 237-250), и эти композиции и способы, описанные здесь, будут также применимы к этим и другим NKCAMR.

#### **Активирующие NK-клетки рецепторы (NKCAR)**

Многие активирующие NK-клетки рецепторы (NKCAR) принадлежат к суперсемейству Ig (IgSF) (такие рецепторы могут также называться здесь Ig-подобными рецепторами или "ILR"). Активирующие ILR NK рецепторы (AILR) включают в себя, например, CD2, CD16, CD69, DNAX-вспомогательную молекулу-1 (DNAM-1), 2B4, NK1.1; киллерные иммуноглобулин (Ig)-подобные активирующие рецепторы (KAR); ILT/LIR и природные рецепторы цитотоксичности (NCR), такие как NKp44, NKp46 и NKp30. Несколько других NKCAR принадлежат к CLTR-суперсемейству (например, NKRP-1, CD69; CD94/NKG2C и гетеродимеры CD94/NKG2E, гомодимер NKG2D, и, в мышцах, активирующие изоформы Lu49 (такие как Lu49A-D)). Другие NKCAR (например, LFA-1 и VLA-4) принадлежат к суперсемейству интегриновых белков и другие активирующие рецепторы могут иметь даже другие различаемые структуры. Многие NKCAR имеют внеклеточные домены, которые связываются с молекулами MHC-I, и цитоплазматические домены, которые являются относительно короткими и лишены мотивов передачи ингибирующего сигнала (ITIM), характерных для ингибирующих NK рецепторов. Трансмембранные домены этих рецепторов обычно включают в себя заряженный аминокислотный остаток, который облегчает их ассоциацию с ассоциированными с трансдукцией сигнала молекулами, такими CD3zeta, FcсRIγ, DAP12 и DAP10

(2B4, например, является, по-видимому, исключением из этого общего правила), которые содержат короткие аминокислотные последовательности, называемые "активирующим мотивом иммунорецептора на основе тирозина (ITAM)", который размножает сигналы активации NK-клеток. Рецептор 2B4 содержит 4 так называемых мотива переключения Иммунорецепторы на основе тирозина (ITSM) в его цитоплазматическом конце; мотивы ITSM могут быть также обнаружены в NKCAR CS1/CRACC и NTB-A. Эти цитоплазматические домены 2B4 и SLAM содержат два или более уникальных мотива на основе тирозина, которые сходны с мотивами, присутствующими в активирующих и ингибирующих рецепторах, и могут рекрутировать SH2-домен-содержащие белки SHP-2 и SAP (SLAM-ассоциированный белок).

Индуклируемые стрессом молекулы, такие как MIC-A, MIC-B и ULBP в человеке, и Rae-1 и H-60 в мышцах могут служить в качестве лигандов для NKCAR, таких как гомодимер NKG2D. Клеточные углеводы, патогенные антигены и антитела могут также быть лигандами NKCAR. Например, NKR-P1 может связываться с углеводными лигандами и запускать активацию NK-клеток, в частности, против опухолевых клеток, которые проявляют aberrантные картины гликозилирования. Вирусные гемагглютинины могут служить в качестве лигандов для природных цитотоксических рецепторов (NCR), таких как ILR NKCAR NKp30, NKp44, NKp46 и NKp80.

NKCAR могут либо прямо трансдуцировать сигналы активирования, либо могут действовать вместе с адапторными молекулами или другими рецепторами (либо в контексте координированной реакции между рецепторами, которые иногда являются отдельно эффективными, либо в контексте спариваний корецептор/рецептор). Например, NKCAR NCR обычно лишены ITAM и, соответственно, связываются с адапторными молекулами через заряженный остаток в их трансмембранных доменах (например, NKp30 ассоциируется с зета-цепью CD3; NKp44 ассоциируется с DAP12 и/или KARAP; NKp46 связывается с зета-цепью CD3 и FcRIγ-цепью), которые, в свою очередь, способны рекрутировать протеин-тирозинкиназы (ПТК) для размножения активирующих NK-клетки сигналов. CD16, который является NKCAR, важным для опосредуемой NK-клетками ADCC и продуцирования цитокинов, ассоциируется с гомодимерами или гетеродимерами, образованными цепями CD3-зета и/или гамма-цепями. NKG2D, по-видимому, играет комплементарную и/или синергическую роль с NCR и NKCAR в активации NK-клеток. Активация NK-клеток против конкретных мишеней может требовать координированной активации множественных NKCAR или NCR или только действия единственного рецептора. Другие поверхностные молекулы-триггеры, включающие в себя 2B4 и NKp80, по-видимому, функционируют в качестве корецепторов для активации NK-клеток.

Активирующие изоформы KIR человека (например, KIR2DS и KIR3DS) и мышечные белки Ly-49 (например, Ly-49D и Ly-49H) экспрессируются некоторыми NK-клетками. Эти молекулы отличаются от их ингибирующих копий (обсуждаемых ниже) отсутствием ингибирующих мотивов (ITIM) в их относительно более коротких цитоплазматических доменах и имеют заряженную трансмембранную область, которая ассоциирована с трансдуцирующими сигнал полипептидами, такими как связанные дисульфидной связью димеры DAP12.

### **Ингибирующие NK-клетки рецепторы NKCIK**

ILR (IgSF) ингибирующие NK-клетки рецепторы (NKCIK) (I) включают в себя ряд различных KIR человека, специфических в отношении HLA-A, -B или -C-аллотипов. KIR могут распознавать множественные аллели в конкретном аллотипе, например KIR2DL1 распознает HLA-Cw2, 4 и 6-аллотипы. Ингибирующие рецепторы CTLR-суперсемейства включают в себя членов семейства белков CD94/NKG2, которые содержат рецепторы, образованные лектин-подобным CD94 с различными членами семейства NKG2, такими как NKG2A, и распознают неклассические молекулы класса I HLA-E и Qa-1 в людях и мышцах соответственно, и мышечные молекулы Ly49, которые распознают классические молекулы MHC класса I в мышцах. В дополнительном контрасте NKRP1A, Nkrplf и Nkrpld являются ингибирующими рецепторами, лигандами которых не являются MHC-родственными, но являются членами семейства CTLR, экспрессируемыми на различных типах клеток, таких как дендритные клетки, макрофаги и лимфоциты.

Специфические в отношении MHC класса I NKCIK включают в себя рецепторы CTLR Ly-49 (в мышцах); рецепторы IgSF Лейкоцитарные иммуноглобулин-подобные рецепторы (LIR) (в людях), KIR (например, p58 и p70 иммуноглобулин-подобные рецепторы киллерных клеток, в людях), и рецепторы CTLR CD94 NKG2 (в мышцах и в людях). Все MHC-I-специфические NKCIK, по-видимому, используют общий ингибирующий механизм, очевидно включающий в себя фосфорилирование ITIM в их цитоплазматических доменах в ходе связывания MHC-I, и рекрутинг тирозинфосфатаз (например, SHP-1 и SHP-2) к фосфорилированным ITIM, приводя к ингибированию проксимальных протеинтирозинкиназ (ПТК), участвующих в активации NK, через NKCAR.

Ингибирующие гетеродимеры CD94/NKG2, образованные из гликопротеинов CTLR, содержат несущую ITIM молекулу NKG2 (например, NKG2A) и связываются с неклассическими молекулами MHC-I (например, HLA-E в людях и Qa-1 в мышцах).

Лейкоцитарные иммуноглобулин-подобные рецепторы включают в себя несколько членов, содержащих два или четыре Ig-домена и структурно родственных полипептидов KIR. См., например, Fanger et al., 1999 J. Leukocyte Biol. 66: 231-236. LIR включают в себя подсемейства A и B и включают в себя, например, LIR-1 - LIR-8 (несколько из которых называют также ILT-полипептидами, в том числе ILT-1,

ILT-2, LLT-3, ILT-4, ILT-5 и ILT-6. Все полипептиды LIR-1, LIR-2, LIR-3, LIR-5 и LIR-8 содержат два или более ингибирующих передачу сигнала ITIM-доменов.

Ингибирующие рецепторы Ly-49 являются мышинными мембранными дисульфид-связанными гомодимерными гликопротеинами CTLR типа II, которые связываются с различными молекулами MHC-I и доставляют обычно доминантные ингибирующие (негативные) сигналы в NK-клетки. Например, Ly-49A связывается с доменами альфа1/альфа2 молекулы MHC-I H-2Dd, тогда как Ly-49C связывает H-2Kb. NK-клетки человека, по-видимому, лишены гомологов мышинных рецепторов Ly-49. Вместо этого NK-клетки человека экспрессируют KIR, которые не обнаруживаются в мышинных NK-клетках. Хотя рецепторы KIR человека и рецепторы Ly-49 мыши лишены структурной гомологии, они являются функционально ортологичными: Оба типа рецепторов связываются с HLA класса I на клетках-мишенях, приводя к ингибированию NK-опосредуемой цитотоксичности.

#### **Иммуноглобулин-подобные рецепторы KIR киллерных клеток**

Одним важным типом NK-CIR является KIR. Обычно, KIR являются гликопротеинами клеточной поверхности, содержащими один-три внеклеточных иммуноглобулин-подобных домена, которые экспрессируются некоторыми T-клетками, а также большинством NK-клеток человека. Ряд KIR хорошо охарактеризованы (см., например, Carrington and Norman, The KIR Gene Cluster, May 28, 2003, доступный через Национальный Центр Информации биотехнологии (NCBI) Web-сайт в [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono\\_003/chldl.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono_003/chldl.pdf). KIR человека включают в себя KIR2DL и KIR3DL. KIR могут также называться разными другими названиями, такими как CD158e1, CD158k, CD158z, p58 KIR CD158e1 (p70), CD244 и т.д. (см., например, Заявку на Патент США 20040038894, Radaev et al., Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 32: 93-114 (2003), Serweknka et al., Nat. Rev. Immunol. 1:41-49 (2001); Farag et al., Expert Opin. Biol. Ther., 3(2):237-250 (2003); Biassoni et al., J. Cell. Mol. Med., 7(4):376-387 (2003) и Warren et al., British J. Haematology, 121:793-804 (2003), каждая из этих ссылок включена тем самым в эту заявку посредством ссылки в ее полном виде). Структура ряда KIR была выяснена и выявляет заметное структурное сходство между этими белками. См., например, Radaev et al., сурга.

KIR могут быть классифицированы структурно, а также функционально. Например, большинство KIR имеют любые два Ig-домена (58 кДа KIR2D KIR), тогда как другие имеют три Ig-домена (70 кДа KIR3D KIR), которые могут иногда называться молекулами p58 и p70. KIR варьируются также по длине цитоплазматического хвоста. Обычно KIR с относительно длинным цитоплазматическим хвостом (L) доставляет ингибирующий сигнал, тогда как KIR с коротким цитоплазматическим хвостом (S) может активировать NK-или T-клеточные реакции. Номенклатура для KIR соответственным образом может быть основана на количестве внеклеточных доменов (KIR2D или KIR3D) и на том, является ли цитоплазматический хвост длинным (KIR2DL или KIR3DL) или коротким (KIR2DS или KIR3DS). Дополнительная информация по номенклатуре для KIR обеспечена в последующем описании этого изобретения. Некоторые члены "семейства KIR" являются NK-CAR, или более конкретно "KAR" (например, KIR2DS2 и KIR2DS4); они содержат обычно один или более заряженных трансмембранных остатков (например, Lys), которые ассоциированы с адапторной молекулой, имеющей иммуностимуляторный мотив (ITAM) (например, DAP12).

Интрацитоплазматическая часть ингибирующих KIR обычно содержит один или более ITIM, которые рекрутируют фосфатазы. Ингибирующие KIR связываются с альфа1/альфа2-доменами HLA-молекул. Ингибирующие KIR, по-видимому, обычно не требуют ассоциации адаптор-молекула для активности. Если нет иных указаний, такие термины, как "KIR", "KIRs" и т.п., относятся к членам NK-CIR "семейства KIR", а такие термины, как "KAR", "KARs" и т.п., относятся к членам NK-CAR "семейства KIR".

KIR могут связывать молекулы MHC-I (например, некоторые аллотипы HLA класса I), обычно приводя к трансмиссии отрицательного сигнала, который противодействует и может не принимать во внимание (отвергать) стимулирующий, активирующий сигнал (сигналы) для NK-клетки, предотвращая тем самым убивание NK-клеткой ассоциированной потенциальной клетки-мишени (очевидно, посредством фосфорилирования ITIM и рекрутинга тирозинфосфатазы (например, SH2-доменсодержащей протеин-тирозинфосфатазы, такой как SHP-1 и SHP-2), приводя к РТК (например, Syk, TcR и/или ZAP70), дефосфорилированию и/или ингибированию образования комплекса LAT/PLC и ассоциированному разрушению каскада (каскадов) ITAM)). Поскольку вирусы часто подавляют экспрессию MHC класса I в клетках, которые они инфицируют, такие инфицированные вирусом клетки становятся чувствительными к убиванию NK-клетками. Поскольку раковые клетки также часто уменьшались и не имели экспрессии MHC класса I, эти клетки также могут становиться чувствительными к убиванию NK-клетками. Инфицированные клетки могут также изменять белки, связанные в MHC, в зависимости от фосфорилирования. Если это происходит, комплекс MHC-I:белок, который экспрессирует эта клетка, будет измененным. Если NK-ассоциированные KIR не могут связываться с этими "чужеродными" комплексами, ингибирующий сигнал не может быть генерирован и будет происходить лизис.

Все подтвержденные ингибирующие KIR, по-видимому, взаимодействуют с различными субпопуляциями антигенов HLA/MHC, в зависимости от подтипа KIR. В людях, KIR, имеющие два домена Ig (KIR2D) распознают аллотипы HLA-C: KIR2DL2 (ранее обозначаемый p58.2) и близкородственный про-

дукт гена KIR2DL3, оба, распознают эпитоп, разделяемый аллотипами HLA-C группы 1 (Cw1, 3, 7 и 8), тогда как KIR2DL1 (p58.1) распознает эпитоп, разделяемый эквивалентными аллотипами HLA-C группы 2 (Cw2, 4, 5 и 6). Эта специфичность KIR2DL1 диктуется, по-видимому, присутствием остатка Lys в положении 80 аллелей HLA-C группы 2. Узнавание KIR2DL2 и KIR2DL3 диктуется, по-видимому, присутствием остатка Asn в положении 80. Существенное большинство аллелей HLA-C имеют либо остаток Asn, либо остаток Lys в положении 80. Один KIR с тремя доменами Ig, KIR3DL1 (p70), распознает эпитоп, разделяемый аллелями HLA-Bw4. Наконец, гомодимер молекул с тремя доменами Ig, KIR3DL2 (p140) распознает HLA-A3 и -A11.

Индивидуальные MHC-I-специфические рецепторы NK-клеток любого типа (активирующие или ингибирующие) обычно не взаимодействуют со всеми молекулами MHC класса I, но специфически связываются с некоторыми аллотипами (белками, кодируемыми различными вариантами единственного генетического локуса). Индивидуальная NK-клетка также может экспрессировать несколько различных ингибирующих и/или активирующих рецепторов, которые функционируют независимо друг от друга. Например, в людях присутствие или отсутствие конкретного KIR является варибельным от одной NK-клетки к другой в единственном индивидууме. Имеется также высокий уровень полиморфизма KIR в людях, с некоторыми молекулами KIR, присутствующими в некоторых, но не во всех индивидуумах. Хотя KIR и другие MHC-распознающие ингибирующие рецепторы могут быть коэкспрессированы NK-клетками, в репертуаре NK любого конкретного индивидуума обычно имеются клетки, которые экспрессируют единственный KIR; соответственно эта соответствующая активность NK-клеток в этом последнем типе NK-клеток ингибируется только клетками, экспрессирующими специфическую группу аллелей MHC-I. Действительно, недавние определения степени разнообразия генотипа KIR в этой популяции предполагают, что можно ожидать, что <0,24% неродственных индивидуумов имеют идентичные генотипы. Наиболее обычный гаплотип Индо-Европейской группы населения, гаплотип "А" (частота ~47-59%), содержит только один ген активирующего KIR (KIR2DS4) и шесть локусов ингибирующего KIR (KIR3DL3, -2DL3, -2DL1, -2DL4, -3DL1 и -3DL2). Остальные гаплотипы "В" являются очень разнообразными и содержат 2-5 локусов активирующего KIR (включающих в себя KIR2DS1, -2DS2, -2DS3 и -2DS5).

Следует отметить, что KIR известны несколькими алиазами, как отображено здесь в табл. 1, которая включает в себя информацию, полученную из Web-сайта Hugo Gene Nomenclature Committee (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/kir.html>) и Andre et al., Nature Immunol. 2(8):661 (2001).

Таблица 1. Номенклатура KIR

KIR	Полное название	Алиазы	ID доступа
KIR2DL1	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, два домена, длинный цитоплазматический хвост, 1	cl-42, nkat1, 47,11, p58,1, CD158a	L41267
KIR2DL2	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, два домена, длинный цитоплазматический хвост, 2	cl-43, nkat6, CD158b1, p58.2	L76669
KIR2DL3	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, два домена, длинный цитоплазматический хвост, 3	cl-6, nkat2, nkat2a, nkat2b, p58.3, CD158b2	L41268
KIR2DL4	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, два домена, длинный цитоплазматический хвост, 4	103AS, 15.212, CD158d, p70	X97229

## 035033

KIR2DL5A	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, два домена, длинный цитоплазматический хвост, 5A	KIR2DL5.1, CD158f	AF21485
KIR2DL5B	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, два домена, длинный цитоплазматический хвост, 5B	KIR2DL5.2, KIR2DL5.3, KIR2DL5.4	AF217486
KIR2DS1	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, два домена, короткий цитоплазматический хвост, 1	EB6ActI, EB6ActII, CD158h, p50.1	X89892
KIR2DS2	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, два домена, короткий цитоплазматический хвост, 2	cl-49, nkat5, 183ActI, CD158j, p50.2	L76667
KIR2DS3	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, два домена, короткий цитоплазматический хвост, 3	nkat7	L76670
KIR2DS4	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, два домена, короткий цитоплазматический хвост, 4	cl-39, KKA3, nkat8, CD158i, p50.3	L76671
KIR2DS5	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, два домена, короткий цитоплазматический хвост, 5	nkat9, CD158g	L76672
KIR2DP1	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, два домена, псевдоген 1	KIRZ, KIRY, KIR15, KIR2DL6	AF204908

KIR3DL1	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, три домена, длинный цитоплазматический хвост, 1	c1-2, NKB1, c1-11, nkat3, NKB1B, AMD11, KIR, CD158e1	L41269
KIR3DL2	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, три домена, длинный цитоплазматический хвост, 2	c1-5, nkat4, nkat4a, nkat4b, CD158k, p140	L41270
KIR3DL3	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, три домена, длинный цитоплазматический хвост, 3	KIRC1, KIR3DL7, KIR44, CD158z	AF352324
KIR3DS1	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, три домена, короткий цитоплазматический хвост, 1	nkat10, CD158e2	L76661
KIR3DP1	иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток, три домена, псевдоген 1	KIRX, KIR48, KIR2DS6, KIR3DS2P, CD158c	AF204919, AF204915, AF204917

#### Нейтрализация NKСIR-ассоциированного ингибирования NK-клеток

Анти-NKСIR-антитела также или альтернативно могут быть охарактеризованы на основе их способности блокировать или нейтрализовать ингибирование NK и посредством этого потенцировать активность против блокированных в противном случае клеток-мишеней. Как указано выше, анти-NKСIR-антитела, которые связываются по меньшей мере с одним NKСIR на протяжении достаточного периода времени для нейтрализации NKСIR-опосредуемого ингибирования цитотоксичности NK-клеток в NK-клетках, могут быть использованы в контексте этого изобретения. Такие анти-NKСIR-антитела могут быть использованы непосредственно в качестве терапевтических агентов в нативной форме (например, без конъюгации с цитотоксическим агентом). Одним более конкретным полезным признаком этого изобретения являются анти-NKСIR-антитела, которые перекрестно реагируют с двумя или более NKСIR и нейтрализуют ингибирующую активность, ассоциированную с некоторыми или всеми (обычно предпочтительно со всеми) из таких ассоциированных NKСIR.

Нейтрализующие анти-NKСIR-антитела могут частично или полностью нейтрализовать NKСIR-опосредованное ингибирование цитотоксичности NK-клеток. Нейтрализацией называют любое существенное блокирование присутствующих в противном случае ингибирующих сигналов. Нейтрализация может измеряться любым подходящим способом. В одном аспекте нейтрализация ингибирования отражается в том, что нейтрализующее KIR-антитело (антитела) вызывает (вызывают) по меньшей мере приблизительно 20%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 75% или более (например, приблизительно 25-100%) увеличение в опосредуемом NK-клетками специфическом лизисе в конкретной смеси NK и NK-клеток-мишеней в сравнении с величиной специфического лизиса, который обычно осуществляется, по существу, в идентичной обстановке без присутствия анти-NKСIR-антитела (анти-NKСIR-антител). Процентное увеличение в этом аспекте может быть определено с учетом анти-NKСIR-антител или других антител, например, сравнением результатов тест-анализов токсичности с высвобождением хрома, полученных из смеси NK-клеток-мишеней и NK-клеток, не блокированных ассоциированными с ними NKСIR(s) (100%), и смеси NK-клеток и NK-клеток-мишеней, в которых эти NK-клетки-мишени презентуют лиганд для NKСIR (0%). В случае анти-KIR-антител может проводиться сравнение с результатами тест-анализов токсичности с высвобождением хрома, полученными из смеси NK-клеток-мишеней и NK-клеток, не блокированных ассоциированными с ними KIR(s) (100%), и смеси NK-клеток и NK-клеток-мишеней, в которых эти NK-клетки-мишени презентуют родственную молекулу MHC класса I для ингибирующего KIR на этих

НК-клетках (0%). В одном выгодном аспекте это изобретение обеспечивает анти-NKCIR-антитела, которые индуцируют лизис клетки (клеток), которая (которые) не могли бы эффективно лизироваться без присутствия такого анти-NKCIR-антитела. Альтернативно, нейтрализация ингибирующей активности NKCIK может быть показана, например, результатами анализа хрома с использованием клона НК-клетки или трансфектанта, экспрессирующего один или более ингибирующих NKCIK (например, KIR, NKG2, NKG2A и LIR (например, LILRB1, LILRB5)) и клетки-мишени, экспрессирующей только один лиганд (например, полипептид или аллель HLA, HLA-E и т.д.), который распознается одним из NKCIK на этой НК-клетке, где уровень цитотоксичности, полученный с этим антителом, равен по меньшей мере приблизительно 20%, например, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70% или более (например, приблизительно 25-100%) цитотоксичности, наблюдаемой с известным блокирующим антителом к лиганду NKCIK. Например, при тестировании анти-KIR-антитела молекулу анти-MHC класса I вводят, по существу, в идентичных условиях, например анти-MHC класса I-антитело W6/32, которое в настоящее время доступно, например, из Research Diagnostics, Flanders, NJ, USA и описано, например, в Shields et al., *Tissue Antigens*. 1998 May; 51 (5): 567-70.

Анализы с высвобождением хрома и другие способы оценивания цитолитической активности НК-клеток известны в данной области. Условия для таких анализов также хорошо известны. Один типичный анализ высвобождения хрома выполняют мечением клеток-мишеней (например, Cw3- и/или Cw4-положительных клеточных линий например, при приблизительно 5000 клетках на лунку в микротитрационном планшете) с использованием  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  (так что этот  $^{51}\text{Cr}$  поглощается и удерживается жизнеспособными клетками-мишенями), промыванием для удаления избытка радиоактивности, после чего экспонированием НК-клеткам в течение периода приблизительно 4 ч в присутствии или в отсутствие анти-NKCIR-антитела (анти-NKCIR-антител) при подходящем отношении эффектор:мишень (например, приблизительно 4:1) и измерением на последующие уровни  $^{51}\text{Cr}$ , отражающие гибель и лизис клеток. Один пример такого анализа описан, например, в Moretta et al., 1993, *J Exp Med* 178, 597-604. В сходном анализе пролиферирующие клетки-мишени могут быть помечены  $^3\text{H}$ -тимидином, который включается в реплицирующуюся ДНК. После цитолитического воздействия НК-клетками, ДНК клеток-мишеней быстро фрагментируется и удерживается в фильтрате, тогда как большая, нефрагментированная ДНК может быть собрана на фильтре, так что можно измерить либо высвобождение этих фрагментов, либо удержание  $^3\text{H}$ -тимидина в клеточной ДНК. Другие примеры и относящиеся к таким анализам обсуждения может быть найдено, например, в Заявке РСТ № WO 2006/072625.

В другом аспекте это изобретение обеспечивает анти-NKCIR-антитела, характеризующиеся способностью конкурировать с перекрестно реактивными и/или нейтрализующими анти-NKCIR-антителами за связывание с родственными NKCIK и/или с той же самой антигенной детерминантной областью/эпитопом, с которой связываются такие известные антитела. Фраза "конкурирует с" при ссылке на конкретное моноклональное антитело (например, 1-7F9, и т.д.) означает, что это анти-NKCIR-антитело конкурирует с этим ссылочным антителом или другой молекулой в анализе связывания с использованием либо рекомбинантных молекул NKCIK, либо экспрессируемых на поверхности молекул NKCIK. Например, если анти-NKCIR-антитело детектируемо уменьшает связывание 1-7F9 с молекулой KIR, обычно связанной 1-7F9 в анализе связывания, можно сказать, что это анти-KIR-антитело "конкурирует" с 1-7F9. Анти-KIR-антитело, которое "конкурирует" с 1-7F9, может конкурировать с 1-7F9 за связывание с рецептором KIR2DL1 человека, рецептором KIR2DL2/3 человека или как с KIR2DL1, так и с KIR2DL2/3 рецепторами человека.

Хотя часто встречающееся, описание белка в зависимости от конкуренции со ссылочным связывающим белком в сравнении со способностью этого белка связываться с тем же самым эпитопом, с которым связывается ссылочный белок, в некоторых случаях подразумевает значимо различные биологические и физико-химические свойства. Конкуренция между связывающими белками подразумевает, что тестируемое анти-NKCIR-антитело связывается с эпитопом, который, по меньшей мере, частично перекрывается с эпитопом, связанным анти-NKCIR-антителом, или расположен достаточно близко с таким эпитопом, так что такое анти-KIR-антитело конкурирует с известными анти-NKCIR-антителами вследствие пространственного затруднения. Анти-NKCIR-антитело может конкурировать со ссылочным анти-NKCIR-антителом без связывания с тем же самым или сходным эпитопом вследствие большого размера этих антител. Такое конкурирующее анти-NKCIR-антитело может быть полезным в блокировании взаимодействий, ассоциированных с той же самой антигенной детерминантой (эпитопом), что и ссылочное анти-NKCIR-антитело, даже когда оно связывает отличающуюся антигенную детерминанту.

В другом примерном аспекте это изобретение обеспечивает анти-NKCIR-антитело, которое связывается по существу с той же самой областью антигенной детерминанты, что и анти-NKCIR-антитело, такое как 1-7F9, DF200 и/или NKVSF1 (для KIR), или антитело Z199 (для NKG2A, доступное из Beckman Coulter, CA), и т.д.

Конкуренцией называют любое значимое уменьшение в склонности конкретной молекулы связывать конкретный партнер связывания в присутствии другой молекулы, которая связывает этот партнер связывания. Обычно конкуренция обозначает по меньшей мере приблизительно 15% уменьшение в свя-

звании, например по меньшей мере приблизительно 20% уменьшение в связывании (например, уменьшение в связывании приблизительно 25% или более, приблизительно 30% или более, приблизительно 15-35% и т.д.) между, например, анти-KIR-антителом и по меньшей мере одним KIR в присутствии конкурирующей молекулы, например анти-KIR-антитела. В некоторых ситуациях, например в случаях, в которых эпитопы, принадлежащие конкурирующим антителам, расположены тесно в антигене, конкуренция может быть заметной по более высокому, чем приблизительно 40% относительному ингибированию связывания рецептора (например, KIR), по меньшей мере приблизительно 50% ингибированию, по меньшей мере приблизительно 55% ингибированию, по меньшей мере приблизительно 60% ингибированию, по меньшей мере приблизительно 75% ингибированию или более высокому уровню ингибирования, например по уровню ингибирования приблизительно 45-95%.

Оценивание конкуренции обычно включает в себя оценивание относительного ингибирующего связывания с использованием первого количества первой молекулы (например, анти-KIR-антитела); второго количества второй молекулы (например, известного анти-KIR-антитела) и третьего количества третьей молекулы (например, KIR), где первое, второе и третье количества являются достаточными для обеспечения сравнения, которое дает информацию о селективности и/или специфичности обсуждаемых молекул относительно других предоставленных молекул. Обычно, для конкурентных анализов ELISA используют приблизительно 5-50 мкг (например, приблизительно 10-50 мкг, приблизительно 20-50 мкг, приблизительно 5-20 мкг, приблизительно 10-20 мкг и т.д.) анти-KIR-антитела, одного известного анти-KIR-антитела и по меньшей мере одного KIR для оценивания, существует ли конкуренция. Условия должны быть подходящими для связывания конкурирующих молекул с их предположительной/известной мишенью. Физиологические или близкие к физиологическим условиям (например, температура около 20-40°C, pH приблизительно 7-8 и т.д.) могут быть обычно подходящими для анти-KIR-антитела:KIR.

Определение конкуренции (или относительного ингибирования связывания) между двумя или более молекулами может выполняться с использованием иммуноанализов, в которых контрольную NKCIK-связывающую молекулу (например, 1-7F9) и тестируемое анти-NKCIK-антитело смешивают (или адсорбируют) и применяют к пробе, содержащей релевантные KIR, такие как KIR2DL1 и KIR2DL2/3, каждый из которых, как известно, связывается DF200.

Протоколы на основе ELISA, радиоиммуноанализов, Вестерн-блоттинга и т.п. являются подходящими для применения в таких конкурентных анализах. Конкурентные анализы ELISA обычно выполняют в условиях, подходящих для связывания этих молекул (например, физиологических условий, в частности, в случае антител, которые связывают конформационные/нелинейные эпитопы). Конкуренция может также оцениваться, например, с использованием теста проточной цитометрии, SPR-анализа и других способов, которые можно найти, например, в Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), Ausubel et al., Eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, (5<sup>th</sup> edition), John Wiley & Sons (2002) и Muller, Meth. Enzymol. 92: 589-601 (1983)).

Область антигенной детерминанты или эпитоп может быть идентифицирована рядом известных способов. Например, область антигенной детерминанты может быть быстро идентифицирована анализами "футпринтинга", например, посредством химической модификации доступных аминов/карбоксилатов в NKCIK-белках-мишенях. Одним конкретным примером такого способа футпринтинга является применение обмена водород-дейтерий, детектируемого масс-спектрометрией (HXMS), где осуществляется обмен водород/дейтерий рецептора и амидных протонов белка-лиганда, связывание и обратный обмен, где амидные группы скелета молекулы, участвующие в связывании белков, защищены от обратного обмена и, следовательно, будут оставаться дейтеризированными. Релевантные области могут быть идентифицированы в этой точке пептическим протеолизом, быстрым разделением высокоэффективной жидкостной хроматографией с микрокалбром и/или масс-спектрометрией с ионизацией с использованием электроспрея. См., например, Ehring H, *Analytical Biochemistry*, Vol. 267 (2) pp. 252-259 (1999) and/or Engen, J.R. and Smith, D.L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265A.

Другим примером подходящего способа идентификации эпитопа является картирование эпитопа с использованием ядерного магнитного резонанса (ЯМР), где обычно сравнивают положение сигналов в двухмерных ЯМР-спектрах свободного антигена и антигена, находящегося в комплексе с антигенсвязывающим пептидом, таким как антитело. Этот антиген обычно является селективно изотопно меченым <sup>15</sup>N, так что в этом ЯМР-спектре наблюдаются только сигналы, соответствующие этому антигену, и не наблюдаются сигналы из антигенсвязывающего пептида. Сигналы антигена, происходящие из аминокислот, участвующих во взаимодействии с антигенсвязывающим пептидом, обычно будут смещать положение в спектрах этого комплекса в сравнении со спектрами свободного антигена, и аминокислоты, участвующие в этом связывании, могут быть таким образом идентифицированы. См., например, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44) :149-67; Huang et al., *Journal of Molecular Biology*, Vol. 281 (1) pp. 61-67 (1998); и Saito and Patterson, *Methods*. 1996 Jun; 9(3): 516-24.

Картирование/характеристика эпитопов могут также выполняться с использованием способов масс-спектрометрии. См., например, Downward, *J Mass Spectrom.* 2000 Apr;35(4): 493-503 и Kiselar and Dow-

nard, *Anal Chem.* 1999 May 1; 71 (9): 1792-801.

Способы расщепления протеазами могут быть также применимыми в контексте картирования и идентификации эпитопов. Относящиеся к антигенным детерминантам области/последовательности могут быть определены расщеплением протеазами, например, с использованием трипсина в соотношении 1:50 к NKCIK в расщеплении в течение ночи при 37°C и pH 7-8, с последующим анализом масс-спектрометрией (MS) для идентификации пептидов. Пептиды, защищенные от расщепления трипсином анти-NKCIK-связывающим фактором, могут быть впоследствии идентифицированы сравнением проб, подвергнутых расщеплению трипсином, и проб, инкубированных с антителом и затем подвергнутых расщеплению трипсином (с выявлением посредством этого футпринта для связывающего фактора). Другие ферменты, такие как хемотрипсин, пепсин и т.д., также или альтернативно могут быть использованы в сходных способах характеристики эпитопов. Кроме того, ферментативное расщепление может обеспечивать быстрый способ для анализа, находится ли потенциальная последовательность антигенной детерминанты в области NKCIK в контексте анти-NKCIK-полипептида, который не экспонирован на поверхности и, соответственно, наиболее вероятно, не является релевантным в отношении антигенности. См., например, Manca, *Ann Ist Super Sanita.* 1991; 27(1):15-9 в отношении обсуждения сходных способов.

Различные способы фагового дисплея могут быть также использованы для идентификации эпитопов. См., например, Wang and Yu, *Curr Drug Targets.* 2004 Jan;5(1): 1-15; Burton, *Immunotechnology.* 1995 Aug; 1(2):87-94; Cortese et al., *Immunotechnology.* 1995 Aug; 1(2) : 87-94; и Irving et al., *Curr Opin Chem Biol.* 2001 Jun; 5(3):314-24. Консенсусные эпитопы могут быть также идентифицированы посредством модифицированных, связанных с фаговым дисплеем способов (см. например, Mumeу et al., *J. Comput. Biol.* 10:555-567 and Mumeу, *Proceedings of the Sixth Annual International Conference on Computational Molecular Biology (RECOMB-02)*, pp. 233-240 (ACM Press, New York)) в отношении обсуждения (см. также Bailey et al., *Protein Science* (2003), 12:2453-2475; Dromeу et al., *J Immunol.* 2004 Apr 1; 172 (7): 4084-90; Parker et al., *Mol Biotechnol.* 2002 Jan; 20(1):49-62; и Czompoly et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Aug 8; 307 (4): 791-6).

Картирование эпитопов посредством конкурентного связывания с KIR с двумя KIR-связывающими молекулами, где одна является биотинилированной (например, известным анти-NKCIK-антителом) или в противном случае сходно меченой, является другим способом для идентификации релевантных областей антигенных детерминант.

Другие способы, потенциально полезные в картировании эпитопов, включают в себя кристаллографические способы, рентгенографию (например, способы исследования дифракции рентгеновских лучей/последовательности, разработанные Poljak и другими в 1970-1980 годах, и применение технологии Multipin Peptide Synthesis).

Компьютерные способы, такие как анализ последовательностей и анализ трехмерной структуры и докинг, также могут быть использованы для идентификации антигенных детерминант. Например, эпитоп может быть также определен молекулярным моделированием с использованием структуры NKCIK или ее части с докингом этой структуры Fab-фрагмента индивидуального mAb. В случае необходимости, модели NKCIK могут быть получены моделированием гомологии с NKCIK с охарактеризованной структурой с использованием таких программ, как Molecular Operating Environment (MOE), которая доступна из Chemical Computing Group (Montreal, Quebec, Canada -www.chemcomp.com). Эти и другие способы картирования обсуждаются в *Epitope Mapping A Practical Approach* (Westwood and Hay Eds.) 2001 Oxford University Press (см. также Cason, *J Virol Methods.* 1994 Sep;49(2): 209-19).

#### **Характеристика анти-KIR-антител**

Полезные анти-KIR-антитела могут быть классифицированы на основе функциональных характеристик, в частности в связи с их способностью перекрестно реагировать или перекрестно связывать более чем один KIR, например, более чем один тип ингибирующего KIR, и/или способностью эффективно нейтрализовать NK-ингибирующие сигналы. Это изобретение рассматривает лечение с использованием анти-KIR или комбинации анти-KIR-антител. Примерные анти-KIR-антитела включают в себя, но не ограничиваются ими, анти-KIR2DL1-антитело и анти-KIR2DL2-антитело, или анти-KIR2DL1-антитело и анти-KIR2DL3-антитело, или анти-KIR2DL1-антитело и анти-KIR2DL2-антитело и анти-KIR2DL3-антитело, или анти-KIR-антитело, которое связывает по меньшей мере два различных продукта гена рецептора ингибирующего KIR и способно нейтрализовать KIR-опосредуемое ингибирование цитотоксичности NK-клеток в NK-клетках, экспрессирующих по меньшей мере один из этих двух различных ингибирующих KIR рецепторов человека, или анти-KIR2D-антитело и анти-KIR3D-антитело.

Анти-KIR-антитела, которые эффективно связываются с более чем одним типом KIR, являются особенно выгодным признаком этого изобретения. В одном конкретном примерном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитела, которые связываются по меньшей мере с двумя ингибирующими KIR рецепторами на поверхности NK-клеток. В даже более конкретном иллюстративном аспекте, это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитела, которые связывают общую область антигенной детерминанты рецепторов KIR2DL человека. Еще в одном конкретном аспекте, это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое связывается с рецепторами KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Термин "KIR2DL2/3" может быть использован как для рецепторов как KIR2DL2, так и KIR2DL3.

Эти два рецептора имеют очень высокую гомологию, являются аллельными формами одного и того же гена, и в данной области считается, что они являются взаимозаменяемыми во многих отношениях. Таким образом, в некоторых аспектах KIR2DL2/3 может рассматриваться как единая ингибирующая KIR молекула. Хотя анти-KIR-антитела, которые перекрестно реагируют с KIR2DL2/3, находятся в пределах этого изобретения, анти-KIR-антитела, которые имеют профиль связывания KIR, который включает в себя только KIR2DL2 и KIR2DL3, не считаются "перекрестно реактивными".

Поскольку по меньшей мере один из KIR2DL1 или KIR2DL2/3 присутствует по меньшей мере в приблизительно 90% популяции человека, KIR2DL1-KIR2DL2/3 перекрестно реактивные анти-KIR-антитела могут стимулировать или усиливать активность NK против большей части HLA-C-аллотип-ассоциированных клеток, соответственно, группы 2 HLA-C-аллотипов и группы 1 HLA-C-аллотипов. Композиция, содержащая единственные KIR-антитела, имеющие такую перекрестную реактивность, могут быть использованы в лечении или диагностике большинства субъектов-людей, с устранением посредством этого необходимости генетического анализа этого пациента и уменьшения количества различных антител, которые должны вводиться пациенту для гарантии эффективного результата.

Перекрестно реагирующие анти-KIR-антитела могут иметь любой подходящий состав и могут быть получены рядом подходящих способов. Например, перекрестно реактивное анти-KIR-антитело может содержать ряд KIR-лигандов и/или последовательностей анти-KIR-антител, которые связываются с различными KIR, которые могут быть ассоциированы конъюгацией, мультимеризацией или (в случае пептидных лигандов) находиться в слитом белке. В другом аспекте обеспечено анти-KIR-антитело, которое содержит последовательности анти-KIR-антитела из перекрестно реагирующего анти-KIR-антитела.

Известны перекрестно реагирующие анти-KIR-антитела, из которых могут быть получены или произведены KIR-связывающие последовательности. Один пример такого антитела описан, например, в Watzl et al., *Tissue Antigens*, 56, p. 240 (2000). Другим примером является SF1 (также называемый pan2D mAb; узнающий общий эпитоп CD158a (KIR2DL1), CD158b (KIR2DL2) и p50.3 (KIR2DS4)), имеющий вариабельную область и CDR-последовательности, показанные, например, на фиг. 15 Заявки PCT на патент WO 2006/003179 (Innate Pharma; Novo Nordisk; University of Genoa). Моноклональное антитело DF200, которое реагирует с различными членами семейства KIR, в том числе KIR2DL1 и KIR2DL2/3, является другим примером такого перекрестно реагирующего антитела. Гибридома, которая продуцирует DF200, была депонирована в коллекции культур CNCM в виде Идентификационного номера "DF200", регистрационного номера CNCM 1-3224, зарегистрирована 10 июня 2004 г., Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, France. Несколько дополнительных моноклональных антител могут быть генерированы и продемонстрированы как являющиеся перекрестно реактивными анти-KIR-антителами. Другими примерами являются антитела 1-7F9 и 1-4F1, описанные в WO 2006/003179.

Перекрестно реактивное анти-KIR-антитело может иметь любую подходящую аффинность и/или avidность в отношении двух или более KIR, с которыми оно связывается. Аффинностью называют силу связывания анти-KIR-антитела или другого антигенсвязывающего белка с эпитопом или антигенной детерминантой. Обычно аффинность измеряют в единицах константы диссоциации  $K_D$ , определяемой как  $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$ , где  $[Ab-Ag]$  является молярной концентрацией комплекса антитело-антиген,  $[Ab]$  обозначает молярную концентрацию несвязанного антитела и  $[Ag]$  обозначает молярную концентрацию несвязанного антигена. Константа аффинности  $K_a$  определяется в виде  $1/K_D$ . Подходящие способы для определения специфичности и аффинности связывающего пептида конкурентным ингибированием, равновесным диализом и т.п. могут быть найдены, например, в Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. и Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), и Muller, *Meth. Enzymol.* 92: 589-601 (1983).

Обычно анти-KIR-антитело, обеспечиваемое этим изобретением, имеет аффинность по меньшей мере одного KIR в диапазоне приблизительно  $10^4$  - приблизительно  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  (например, приблизительно  $10^7$  - приблизительно  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ). Термин "иммунореагирует" обычно относится здесь к связыванию анти-KIR-антитела с KIR с константой диссоциации  $K_D$ , меньшей чем приблизительно  $10^{-4} \text{ M}$ . Например, в одном конкретном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое имеет среднюю константу диссоциации ( $K_D$ ) приблизительно  $7 \times 10^{-9} \text{ M}$  или более в отношении KIR2DL1 и KIR2DL2/3, как определено, например, скринингом резонанса поверхностных плазмонов (SPR) (например анализом с VIAcore™ SPR-аналитическим устройством). В более конкретном примерном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитела, которые имеют  $K_D$  приблизительно  $2 \times 10^{-9} \text{ M}$  (например, приблизительно  $0,1-4 \times 10^{-9} \text{ M}$ ) или более для KIR2DL2/3 и приблизительно  $11 \times 10^{-9} \text{ M}$  (например, приблизительно  $7-15 \times 10^{-9} \text{ M}$ ) или более для KIR2DL1.

Аффинность может быть определена любым из способов, описанных здесь в другом месте, или их известных в данной области эквивалентов. Пример одного способа, который может быть использован для определения аффинности, обеспечен в анализе Скетчарда Munson & Pollard, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980). Аффинность связывания может быть также определена равновесными способами (например,

ELISA или радиоиммуноанализом (RIA)) или анализом кинетики (например, анализом BIAcore™).

Анти-KIR-антитела могут быть также или альтернативно охарактеризованы проявлением связывания KIR с константой диссоциации менее чем приблизительно 100 нМ, менее чем приблизительно 50 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ, приблизительно 5 нМ или менее, приблизительно 1 нМ или менее, приблизительно 0,5 нМ или менее, приблизительно 0,1 нМ или менее, приблизительно 0,01 нМ или менее или даже приблизительно 0,001 нМ или менее.

Авидностью называют всю силу общих взаимодействий между связывающим белком и антигеном (например, общую силу взаимодействий между анти-KIR-антителом и KIR). Аффинность является силой общих нековалентных взаимодействий между единственным антигенсвязывающим сайтом на антителе или другом связывающем пептиде и единственным эпитопом или антигенной детерминантой. Авидность обычно регулируется тремя основными факторами: внутренней аффинностью связывающего белка в отношении эпитопа (эпитопов) или антигенной детерминанты (антигенных детерминант), с которыми он связывается, валентностью этого антитела или связывающего белка и антигена (например, анти-KIR-антитело с валентностью три, четыре или более будет обычно проявлять более высокие уровни авидности в отношении антигена, чем бивалентное антитело, и бивалентное антитело будет иметь более высокую авидность в отношении антигена, чем одновалентное антитело, особенно при наличии повторяемых эпитопов в этом антигене), и/или геометрическим расположением взаимодействующих компонентов. Авидность обычно измеряют тем же самым типом способов, который используют для оценивания аффинности.

В другом аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое перекрестно реагирует с KIR из двух или более видов. Например, в одном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое перекрестно реагирует с KIR человека и собакоподобных обезьян. В одном конкретном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое перекрестно реагирует по меньшей мере с двумя KIR человека и также связывается с NK-клетками собакоподобных обезьян. Такое анти-KIR-антитело может содержать последовательности, которые получены из антитела NKVSF1, которое обнаруживает профиль перекрестной реактивности. Такие анти-KIR-антитела могут быть подвергнуты тестированию на токсичность и другим подходящим исследованиям в собакоподобных обезьянах, в случае необходимости.

Антитела, которые являются перекрестно реагирующими с различными KIR, могут быть использованы в комбинированных композициях и способах этого изобретения. Примерные профили перекрестной реактивности таких антител включают в себя антитела, которые перекрестно реагируют с KIR 2DL1 плюс 2DL2/3, 3DL1 плюс 3DL2, 2DL1 (и 2DL2/3) плюс 2DS4 и 2DL1 (и 2DL2/3), но не с 2DS4.

Так, например, способы или композиции данного изобретения могут содержать анти-KIR-антитело, которое связывает KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и уменьшает или блокирует ингибирование KIR-опосредованной цитотоксичности NK-клеток, как описано, например, в WO 2005003168.

Примерные анти-KIR-антитела, используемые в комбинированных способах и композициях этого изобретения, включают в себя анти-KIR-антитела, содержащие VL-область, которая соответствует VL-области анти-KIR-антитела DF200, или содержит, по существу, такую VL-область (будучи, по существу, сходной и удерживающей сходный способ связывания и аффинности) или VL последовательность/домен, который является в сильной степени подобным (например, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичным или на 95% идентичным) VL-последовательности DF200. VL-последовательность DF200 показана в WO 2006/3179. Такие анти-KIR-антитела могут также альтернативно определяться сопоставлением набора CDR варибельной области легкой цепи DF200 (также показанной в WO 2006/3179). Такое антитело обычно будет также содержать либо VH-домен DF200, либо в высокой степени сходную последовательность (например, последовательность, имеющую высокую идентичность с VH-доменом DF200 или в противном случае, по существу, состоящую из такой последовательности), или по меньшей мере CDR варибельной области тяжелой цепи DF200 (показанной в WO 2006/3179).

В данном контексте термин "процентная идентичность последовательности" или "идентичность последовательности" относится к процентной идентичности между двумя последовательностями, которая является функцией количества идентичных положений, являющихся общими для этих последовательностей, т.е.  $\% \text{ гомология} = \# (\text{количество}) \text{ идентичных положений/общее } \# (\text{количество}) \text{ положений} \times 100$ , с учетом количества гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимального сопоставления этих двух последовательностей. Сопоставление последовательностей и определение процентной идентичности между двумя последовательностями могут выполняться с использованием математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

Процентная идентичность между двумя аминокислотными последовательностями может быть определена с использованием алгоритма E. Myers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1998)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), использующую таблицу PAM120 весов остатков, штраф длины гэпа 12 и штраф гэпа 4. Кроме того, процентная идентичность между двумя аминокислотными последовательностями может быть определена с использованием алгоритма Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в пакете программного

обеспечения (доступную в [www.qcqc.com](http://www.qcqc.com)), использующую либо матрицу Blossum 62, либо матрицу PAM250 и вес гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и вес длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В некоторых случаях последовательности белков данного изобретения могут быть дополнительно использованы в качестве "последовательности запроса" для выполнения поиска в базах данных общего пользования, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски могут выполняться с использованием программы XBLAST (версии 2.0) Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10. Поиски белков BLAST могут выполняться с программой XBLAST, оценка=50, длина слова=3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных антителам этого изобретения. Для получения сопоставлений с использованием гэпов для сравнительных целей, может быть использована программа Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST, могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См., [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

В другом примерном аспекте комбинированная композиция или способ этого изобретения включают в себя анти-KIR-антитело, содержащее последовательности VH и VL, которые соответствуют или являются в высокой степени сходными (например, состоит по существу из) с последовательностями VH и VL антитела 1-7F9 (показанное в WO006/3179), или, по меньшей мере, содержит CDR VL и VH 1-7F9.

#### **Конкуренция с перекрестно реактивными и/или нейтрализующими анти-KIR-антителами**

В другом аспекте способы или композиции этого изобретения характеризуются содержанием анти-KIR-антитела, которое конкурирует с одним из этих антител или одним из других анти-KIR-антител, описанных в ссылках, включенных здесь (например, 1-7F9).

Антитела, которые конкурируют с примерными анти-KIR-антителами, такими как DF200, 1-7F9 и/или NKVSF1, могут быть идентифицированы с использованием известных способов скрининга. Ряд таких способов рутинным образом практикуется и хорошо известны в данной области (см., например, Патент США № 5660827, который включен здесь специально посредством ссылки). Протоколы на основе, например, ELISA, радиоиммуноанализов, Вестерн-блоттинга и применение анализа BIACORE являются подходящими в таких конкурентных исследованиях.

Можно, например, предварительно смешивать контрольное антитело (например, DF200, NKVSF1 или 1-7F9) с варьирующимися количествами тест-антитела (например, в соотношениях приблизительно 1:1, 1:2, 1:10 или приблизительно 1:100) в течение некоторого периода времени для внесения в пробу антигена KIR. Альтернативно, контроль и варьирующиеся количества тест-антитела могут быть просто добавлены отдельно и смешаны во время подвергания действию пробы антигена KIR. Пока связанные антитела могут отличаться от свободных антител (например, с использованием способов отделения или промывания для элиминации несвязанных антител) и контрольного тест-антитела (например, с использованием видов, специфических или изотип-специфических вторичных антител, или специфического меченного контрольного антитела детектируемой меткой), можно определить, уменьшает ли этот тест-антитело связывание контрольного антитела с различными антигенами KIR2DL, показывая, что это тест-антитело узнает по существу тот же самый эпитоп, что и контроль. Связывание (меченого) контрольного антитела в присутствии полностью не относящегося к делу антитела (которое не связывает KIR) может служить в качестве верхней величины контроля. Нижняя величина контроля может быть получена инкубированием меченого контрольного антитела с тем же самым, но немеченым контрольным антителом, где конкуренция могла бы осуществляться и уменьшать связывание этого меченого антитела. В одном тест-анализе, значимое уменьшение реактивности меченого антитела в присутствии тест-антитела указывает на то, что это тест-антитело является антителом, которое узнает по существу тот же самый эпитоп, т.е. антителом, которое конкурирует с меченым контрольным антителом. Например, любое тест-антитело которое уменьшает связывание контрольного антитела с одним или обоими из антигенов KIR2DL1 и KIR2DL3 по меньшей мере на приблизительно 50%, например по меньшей мере приблизительно на 60% или более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 70% (например, приблизительно на 65-100%), в любом соотношении контроль:антитело между приблизительно 1:1 или 1:10 и приблизительно 1:100, считается антителом, которое конкурирует с этим контролем.

Конкуренция может также оцениваться, например, проточной цитометрией. В таком тесте клетки, несущие конкретный KIR, могут быть инкубированы сначала с контрольным антителом и затем с тест-антителом, меченым флуорохромом или биотином. Говорят, что антитело конкурирует с контрольным антителом, если связывание, полученное после преинкубации с насыщающим количеством контрольного антитела, составляет приблизительно 80%, предпочтительно приблизительно 50%, приблизительно 40% или менее (например, приблизительно 30%) связывания (измеряемого по средней величине флуоресценции), полученного с использованием этого тест-антитела без преинкубации с контрольным антителом. Альтернативно, говорят, что антитело конкурирует с контрольным антителом, если связывание, полученное с меченым контрольным антителом (меченым флуорохромом или биотином), на клетках, преинкубированных насыщающим количеством тест-антитела, составляет приблизительно 80%, предпочтительно приблизительно 50%, приблизительно 40%, или менее (например, приблизительно 30%) связывания, полученного без преинкубации с этим тест-антителом.

Может быть выгодным образом использован простой конкурентный анализ, в котором тест-

антитело предварительно адсорбируют в насыщающей концентрации на поверхности, на которой могут быть иммобилизованы либо KIR2DL1, либо KIR2DL2/3 или оба. Поверхностью в этом простом конкурентном анализе является предпочтительно BIACORE чип (или другая среда, подходящая для анализа резонанса поверхностных плазмонов). Измеряют связывание контрольного антитела с покрытой KIR поверхностью. Это связывание с содержащей KIR поверхностью только контрольного антитела сравнивают со связыванием контрольного антитела в присутствии тест-антитела. Значимое уменьшение в связывании с содержащей KIR2DL1 и KIR2DL2/3-поверхностью этим контрольным антителом в присутствии тест-антитела показывает, что это тест-антитело узнает, по существу, тот же самый эпитоп, что и контрольное антитело, так что это тест-антитело "конкурирует" с контрольным антителом. Любое тест-антитело, которое уменьшает связывание контрольного антитела как с KIR2DL1-, так и с KIR2DL2/3-антигенами по меньшей мере на приблизительно 20% или более, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 70% или более, может рассматриваться как антитело, которое конкурирует с контрольным антителом. Предпочтительно такое тест-антитело будет уменьшать связывание контрольного антитела, по меньшей мере, с каждым из антигенов KIR2DL1, 2 и 3 по меньшей мере на приблизительно 50% (например, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 70% или более). Будет понятно, что порядок контрольных и тест-антител может быть обращен, т.е. контрольное антитело может быть сначала связано с поверхностью и затем тест-антитело приводят в контакт с этой поверхностью после этого в конкурентном анализе. Предпочтительно, антитело, имеющее более высокую аффинность в отношении антигенов KIR2DL1 и KIR2DL2/3, связывается с содержащей KIR2DL1 и KIR2DL2/3 поверхностью первым, так как будет ожидаться, что это уменьшение в связывании, наблюдаемое в отношении второго антитела (при предположении, что эти антитела являются конкурентными), будет иметь более высокую величину. Дополнительные примеры таких анализов обеспечены в Примерах здесь и, например, в работе Saunal and Regenmortel, (1995) *J. Immunol. Methods* 183: 33-41, описание которой включено здесь посредством ссылки.

В другом аспекте эти способ или композиции этого изобретения характеризуются включением только антител, которые не являются перекрестно реактивными с более чем одним KIR. Например, было показано, что моноклональные антитела, специфические только в отношении KIR2DL1, блокируют взаимодействия между аллотипами KIR2DL1 и HLA-Cw4, а также сходными аллотипами HLA-C, принадлежащими к той же самой группе, что и Cw4 (Moretta et al., *J Exp Med.* 1993; 178(2):597-604; описание которой включено здесь посредством ссылки). В другом примере, было также описано, что моноклональные антитела против KIR2DL2/3 блокируют взаимодействия KIR2DL2/3 с аллотипами HLA-Cw3 (или т.п.) (Moretta et al., 1993, supra). Необязательно, это антитело может быть выбрано из группы, состоящей из GL183 (KIR2DL2/3/32-специфического, доступного из Immunotech, France и Beckton Dickinson, USA); EB6 (KIR2DL1/s1-специфического, доступного из Immunotech, France и Beckton Dickinson, USA); AZ138 (KIR3DL1-специфического, доступного из Moretta et al., Univ. Genova, Italy); Q66 (KIR3DL2-специфического, доступного из Immunotech, France); и DX9, Z27 (KIR3DL1-специфического, доступного из Immunotech, France и Beckton Dickinson, USA).

#### Эпитопы

В дополнительных аспектах это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитела, которые направлены на конкретные антигенные области и/или эпитопы, презентуемые на различных KIR. В примерном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитела, которые специфически связывают KIR2DL1 в пределах области, определяемой одним или несколькими аминокислотными остатками, выбранными из 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181 и 192. В другом варианте осуществления это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитела, которые специфически связываются с KIR2DL1 и KIR 2DL2/3 в области, определяемой одной или несколькими аминокислотными остатками 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181 и 192.

В следующем аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитела, которые связываются с KIR2DL1, но которые связываются с мутантом KIR2DL1, в котором R131 является Ala, со значимо уменьшенной аффинностью связывания относительно него (приблизительно 20% или менее, приблизительно 30% или менее, приблизительно 40% или менее, приблизительно 50% или менее, приблизительно 60% или менее, приблизительно 70% или менее и т.д., аффинности, проявляемой в отношении KIR2DL1). В другом аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитела, которые связываются с KIR2DL1, но которые связываются с мутантом KIR2DL1, в котором R157 является Ala, с относительно уменьшенной аффинностью связывания (приблизительно 20% или менее, приблизительно 30% или менее, приблизительно 40% или менее, приблизительно 50% или менее, приблизительно 60% или менее, приблизительно 70% или менее, и т.д., аффинности, проявляемой в отношении KIR2DL1). В другом аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитела, которые связываются с KIR2DL1, но которые связываются с мутантом KIR2DL1, в котором R158 является Ala, с относительно уменьшенной аффинностью связывания (приблизительно 20% или менее, приблизительно 30% или менее, приблизительно 40% или менее, приблизительно 50% или менее, приблизительно 60% или менее, приблизительно 70% или

менее и т.д., аффинности, проявляемой в отношении KIR2DL1).

В следующем аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитела, которые связываются с остатками KIR2DL1 131, 157 и 158.

В дополнительном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитела, которые связываются с KIR2DS3(R131W), но не с KIR2DS3 дикого типа. Еще в одном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитела, которые связываются с KIR2DL1 и KIR2DL2/3, а также с KIR2DS4. Еще в одном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитела, которые связываются как с KIR2DL1, так и с KIR2DL2/3, но не с KIR2DS4.

Для иллюстрации применения последовательностей анти-KIR-антител в композиции и конструировании анти-KIR-антител примерные последовательности анти-KIR-антител и варианты последовательностей антител будут описаны здесь. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот вариабельных областей и CDR примерных анти-KIR-антител DF200 и 1-7F9 описаны также в заявке PCT application № WO 2006/003179, описание которой включено здесь посредством ссылки.

В одном примерном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, содержащее последовательность CDR-L1, которая состоит или по существу состоит из последовательности Lys Ala Ser Gin Asn Val Val Thr Tyr Val Ser (SEQ ID NO: 43). В другом аспекте, это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое содержит CDR-L1, который состоит или по существу состоит из последовательности Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr (SEQ ID NO: 44).

В другом иллюстративном аспекте, это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое содержит последовательность CDR-L2, которая состоит или по существу состоит из последовательности

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr (SEQ ID NO:45).

В одном дополнительном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое также или альтернативно содержит CDR-L2, который состоит или по существу состоит из последовательности

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser (SEQ ID NO:46).

В другом демонстративном аспекте, это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое также или альтернативно содержит CDR-L3, который состоит или по существу состоит из последовательности

Gly Gin Gly Tyr Ser Tyr Phe Tyr Thr (SEQ ID NO:47).

Еще в одном аспекте, это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое также или альтернативно содержит CDR-L3, который состоит или по существу состоит из последовательности

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr (SEQ ID NO:48).

В качестве дополнительного примерного признака это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое содержит CDR-H1, который состоит или по существу состоит из последовательности

Gly Phe Ser Phe Thr Phe Tyr Gly Val His (SEQ ID NO:49).

Еще в одном примерном аспекте, это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое содержит CDR-H2, который состоит или по существу состоит из последовательности

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser (SEQ ID NO:50).

Еще в одном примерном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое содержит CDR-H3, который состоит или по существу состоит из последовательности

Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp Tyr (SEQ ID NO:51).

В другом аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое содержит CDR-H1, который состоит или по существу состоит из последовательности

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His (SEQ ID NO:52).

В дополнительном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое содержит CDR-H2, который состоит или по существу состоит из последовательности

Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly (SEQ ID NO:53).

Другой аспект этого изобретения осуществляется анти-KIR-антителом, которое содержит CDR-H3, который состоит или по существу состоит из последовательности

Pro Thr Thr Ala Thr Arg Ser Ser Ala Met Asp Tyr (SEQ ID NO:54).

Базовыми и новыми свойствами этих последовательностей CDR является способность, в комбинации с другими необходимыми последовательностями CDR и FR связываться с эпитопом (эпитопами), презентированными на одном или нескольких KIR. Как указано выше, может встретиться случай, в котором некоторые остатки в таких последовательностях способствуют малому связыванию или отсутствию связывания с эпитопом KIR. Кроме того, может также или альтернативно встретиться случай, в котором такие последовательности CDR могут переносить одну или небольшое число инсерций без существенного влияния на их характеристики связывания эпитопа (специфичность и/или аффинность). Однако в другом аспекте этого изобретения значительные изменения могут быть произведены в таких последовательностях для получения полезных вариантов. Такие изменения обсуждаются дополнительно ниже.

Эти иллюстративные последовательности CDR могут быть комбинированными друг с другом вариантами последовательностями CDR, описанными ниже, или другими анти-KIR-CDR (обычно из KIR-связывающих анти-KIR-антител). В одном иллюстративном аспекте это изобретение обеспечивает анти-

KIR-антитело, которое содержит большинство или все последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 43, 45, 47, 49, 50 и 51.

В другом иллюстративном аспекте это изобретение обеспечивает антитело, содержащее легкую вариабельную (VL) последовательность, состоящую по существу из последовательности

Met Glu Ser Gln Thr Leu Val

Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys  
Ser Met Ser Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Asn Ser Glu Asn Val Val  
Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser  
Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu  
Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro  
Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg (SEQ ID NO:55).

Эти базовые и новые свойства такой последовательности являются ее вкладом в связывание KIR. Может быть возможным, что некоторые аминокислоты могут быть делетированы, добавлены или заменены в этой последовательности без существенного влияния на такие свойства.

В дополнительном иллюстративном аспекте это изобретение обеспечивает антитело, содержащее последовательность VL, состоящую по существу из последовательности

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe

Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser  
Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser  
Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn  
Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
Ser Ser Met Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:56).

N-концевая часть как SEQ ID NO: 55, так и SEQ ID NO: 56 может быть отщеплена в подходящей клетке-хозяине, если эта последовательность представлена в подходящем контексте (например, первые приблизительно 23 аминокислоты SEQ ID NO: 55 могут быть отщеплены после действия в качестве сигнальной последовательности для последовательности VL, где она является полным содержанием этого обсуждаемого пептида или представляет выставленную N-концевую часть пептида). Таким образом, это изобретение обеспечивает также анти-KIR-антитела, содержащие последовательности VL, состоящие, по существу, из N-концевых укороченных версий SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56 (например, где приблизительно 20 аминокислот их N-концевой части были удалены).

В другом аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое также или альтернативно содержит вариабельную тяжелую (VH) последовательность, состоящую по существу из последовательности

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys Val Leu Ser  
Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys  
Thr Val Ser Gly Phe Ser Phe Thr Pro Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly  
Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg  
Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val  
Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met  
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:57).

Первые 20 аминокислотных остатков этой последовательности могут действовать в качестве сигнальной последовательности для пептида, состоящего или по существу состоящего из этой последовательности или белковой цепи, содержащей эту последовательность, расположенную в подходящем контексте. Таким образом, это изобретение обеспечивает также анти-KIR-антитело, которое содержит VH-последовательность, которая состоит по существу из фрагмента SEQ ID NO: 57, который лишен его первых приблизительно 1-20 остатков.

В другом аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое также или альтернативно содержит вариабельную тяжелую (VH) последовательность, состоящую по существу из последовательности

Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly Val Tyr Ser Glu  
Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys  
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly  
Leu Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly  
Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr  
Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Pro Thr Thr Ala Thr Arg Ser Ser Ala Met Asp  
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:58).

Первые 20 аминокислотных остатков этой последовательности могут действовать в качестве сигнальной последовательности для пептида, состоящего или по существу состоящего из этой последовательности или белковой цепи, содержащей эту последовательность, расположенной в подходящем контексте. Таким образом, это изобретение обеспечивает также анти-KIR-антитело, которое содержит VH-

последовательность, которая состоит по существу из фрагмента SEQ ID NO: 58, который лишен его первых приблизительно 1-20 остатков.

В одном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое содержит VL-последовательность, которая состоит по существу из SEQ ID NO: 55 или ее N-концевой укороченной части, и VH-последовательность, которая состоит по существу из SEQ ID NO: 57 или ее N-концевой укороченной части.

Как уже упоминалось, подходящие варианты последовательностей антигенсвязывающего антитела, такие как последовательности анти-KIR-антитела, могут быть включены в антитела этого изобретения. Могут быть подходящими вариации в большинстве типов. Так, например, анти-KIR-антитело может содержать варианты константные последовательности и/или варианты каркасные последовательности.

В одном аспекте это изобретение обеспечивает анти-KIR-антитело, которое содержит одну или более вариантов последовательностей CDR (т.е. последовательностей CDR, которые отличаются от сходной последовательности CDR дикого типа одной или несколькими аминокислотными инсерциями, делециями, добавлениями и/или заменами, которые влияют на биологические и/или физико-химические свойства этой последовательности в отношении родственной последовательности ее дикого типа). См., например, способы, описанные в Заявке PCT № WO 2006/072625. Варианты последовательностей CDR, VH и VL могут проявлять любой подходящий уровень идентичности относительно одной или нескольких "родительских" последовательностей CDR, VH и VL соответственно, например, последовательностей CDR, VH и VL анти-KIR-mAb DF200 и/или анти-KIR-mAb NKVSF1. Обычно вариантная последовательность, которая связывается, по существу, с идентичной областью антигенной детерминанты в качестве родителя, будет сохранять по меньшей мере приблизительно 40% идентичность аминокислотной последовательности относительно родительской последовательности, например приблизительно 50% или более, приблизительно 60% или более, приблизительно 70% или более, приблизительно 75% или более, приблизительно 80% или более, приблизительно 85% или более, приблизительно 90% или более или по меньшей мере приблизительно 95% (например, приблизительно 45-99%, приблизительно 55-99% или приблизительно 65-99%) идентичность относительно исходной (родительской) последовательности. Однако в некоторых случаях конкретно в отношении последовательностей CDR, нацеленных, по существу, на идентичный эпитоп, могут быть подходящими варианты даже с более низкими уровнями идентичности.

Варианты последовательностей CDR, VH и VL, которые связываются с различными областями антигенных детерминант или различным набором (или "профилем") областей антигенных детерминант, могут быть также генерированы любым из способов, описанных здесь в другом месте (рациональным конструированием, мутагенезом, направленной эволюцией и т.д.). В таких случаях могут ожидать значимо более низкие уровни идентичности с исходной последовательностью. Например, в контексте варианта CDR-L1, CDR-H1, CDR-H2 или CDR H3, имеющего профиль связывания эпитопа, отличающийся от исходной последовательности по идентичности всего лишь на приблизительно 20-30% аминокислотной последовательности, могут быть обнаружены в вариантах, которые способствуют связыванию NKCAMR, таких как KIR.

Заявка PCT № WO 2006/072625 дополнительно обеспечивает варианты последовательностей анти-KIR-антитела, включающие в себя специфические формулы для последовательностей CDR и переменных областей, описания которых включены здесь посредством ссылки.

Обычно варианты отличаются от "родительских" последовательностей большей частью по консервативным заменам; например по меньшей мере приблизительно 35%, приблизительно 50% или более, приблизительно 60% или более, приблизительно 70% или более, приблизительно 75% или более, приблизительно 80% или более, приблизительно 85% или более, приблизительно 90% или более, приблизительно 95% или более (например, приблизительно 65-99%) замен в этом варианте являются консервативными аминокислотными заменами. В контексте этого изобретения консервативные замены могут быть определены заменами в пределах классов аминокислот, показанных в одной из табл. 4, 5 и 6 Заявки на Патент PCT № WO 2006/072625 (Novo Nordisk AS и Innate Pharma SA). Заявка PCT № WO 2006/072625, включенная здесь посредством ссылки, также описывает дополнительные консервативные группировки замен; создание существенных изменений в функции отбором замен, которые являются менее консервативными; принципы, применимые в конструировании и селекции пептидных вариантов; сохранение в смысле гидрофобных/гидрофильных свойств; поддержание структуры вариантных пептидов, по существу, сходной со структурой исходного пептида, в том числе способы для оценивания сходства пептидов в отношении консервативных замен, гидрофобных свойств, сохранения массы, сравнений вторичной структуры или оценки сходства, которые определяются с использованием программы; могут быть приемлемыми другие точки вариации/дивергенции между вариантом и родителем; выгодные изменения последовательности в CDR; вариации последовательности, которые приводят к измененному гликозилированию; инсерции гипервариабельных областей для генерирования вариантного антитела и более часто вариантов CDR.

Идентичность в контексте аминокислотных последовательностей этого изобретения может определяться любым подходящим способом обычно при помощи анализа сопоставления Needleman-Wunsch

(см. Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* (1970) 48:443-453), например, обеспечиваемого через анализ с ALIGN 2.0 с использованием матрицы BLOSUM50 scoring matrix с исходным пенальти гэпа -12 и пенальти удлинения -2 (см. Myers and Miller, *CABIOS* (1989) 4:11-17 в отношении обсуждения глобальных способов сопоставления, включенных в программу ALIGN). Одна копия программы ALIGN 2.0 является доступной, например, через San Diego Supercomputer (SDSC) Biology Workbench. Поскольку сопоставление Needleman-Wunsch обеспечивает полное или глобальное измерение идентичности между двумя последовательностями, должно быть понятно, что последовательности-мишени, которые могут быть частями или субпоследовательностями более длинных пептидных последовательностей, могут быть использованы способом, аналогичным для полных последовательностей, или, альтернативно, величины локального сопоставления могут быть использованы для оценивания взаимосвязи между субпоследовательностями, как определено, например, сопоставлением Smith-Waterman (*J. Mol. Biol.* (1981) 147: 195-197), которое может быть получено при помощи доступных программ (другие способы локального сопоставления, которые могут быть подходящими для анализа идентичности, включают в себя программы, которые используют эвристические алгоритмы локального сопоставления, такие как программы FastA и BLAST. Дополнительные родственные способы для оценивания идентичности описаны, например, в Международной заявке на патент WO 03/048185. Алгоритм Гото, который пытается улучшить алгоритм Needleman-Wunsch, может быть использован для сопоставления глобальных последовательностей. См., например, Gotoh, *J. Mol. Biol.* 162: 705-708 (1982).

### Получение антител

Моноклональные антитела, в частности, могут быть изготовлены с использованием гибридомного способа, впервые описанного Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), или другими хорошо известными, впоследствии разработанными способами (см., например, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Гибридомы и другие слитые клетки могут быть образованы химическим слиянием, электрическим слиянием или любым другим подходящим способом с любым подходящим типом миелом, гетеромиелом, фотобластоидных клеток, плазмацитом или подобных иммортализованных клеток и антитело-экспрессирующих клеток любого подходящего типа.

Трансформированные иммортализованные В-клетки могут быть также использованы для эффективного получения антител. Трансформированные В-клетки могут быть получены стандартными способами, такими как трансформация Вирусом Эпштейна-Барр или трансформирующим геном (см., например, "Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity," Zurawaki V. R. et al., in *Monoclonal Antibodies*, ed. by Kennett R. H. et al., Plenum Press, N.Y. 1980, pp. 19-33). Таким образом, стабильные и непрерывные и/или иммортализованные анти-NKCIR-тело-экспрессирующие клетки и клеточные линии являются другим признаком этого изобретения. Одна стадия способа получения анти-NKCIR-антител может включать в себя, например, стадию получения иммортализованных В-клеток, продуцирующих анти-AMR-антитело и/или анти-STM-антитело, которые сливаются с подходящими партнерами для получения анти-NKCIR-антитела (анти-NKCIR-антител), которые секвенируют, и такие последовательности используют для получения рекомбинантного анти-KIR-антитела.

Клеточные линии в качестве хозяев для экспрессии рекомбинантного белка хорошо известны в данной области и включают в себя многие иммортализованные клеточные линии, доступные из Американской Коллекции Типовых Культур, *inter alia*, клетки яичников Китайского хомячка (CHO), NSO, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почки бэби-хомячка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоклеточной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549 и ряд других клеточных линий. Другими клеточными линиями, которые могут быть использованы, являются клеточные линии насекомых, такие как клетки Sf9. При введении нуклеиновых кислот (или содержащих нуклеиновую кислоту векторов), кодирующих гены антител, в клетки-хозяева млекопитающих, антитела могут быть получены культивированием этих клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для экспрессии этого антитела, в клетках хозяина или, более предпочтительно, секрецией этого антитела в культуральную среду с использованием стандартных способов очистки белков. Антитела могут быть извлечены из лизатов клеток-хозяев при прямой экспрессии без секреторного сигнала.

Очистка антител из клеточных культур, клеточных лизатов и трансгенных животных или полученных из них биологических материалов (например, из асцитной жидкости трансгенного животного, продуцирующего антитела) может быть достигнута применением любого количества подходящих способов, известных в данной области, включающих в себя, например, очистку на иммуноаффинной колонке; осаждение сульфатом, хроматофокусирование; препаративный электрофорез в ДСН-ПААГ и т.п.

Анти-KIR-антитела могут быть также получены в бактериальных клетках и эукариотических одноклеточных микроорганизмах, таких как дрожжи. Продуцируемые бактериальными клетками антитела лишены нормального гликозилирования и, соответственно, могут быть дефектными в отношении функции ADCC и других аспектов иммунной реакции, которая может быть в противном случае ассоциирована по существу с идентичными антителами, продуцируемыми в клетках млекопитающих и/или животных.

Могут быть использованы подходящие способы для очистки, скрининга и селекции антител, вклю-

чающие в себя способы, описанные в WO 2006/072625. Скрининг и селекцию анти-KIR-антител можно выполнять любым подходящим способом или комбинацией способов. Например, могут быть использованы различные форматы иммуноанализа для отбора антител, которые селективно связываются с конкретным белком, вариантом или фрагментом. Например, для отбора антител, селективно иммунореактивных с белком, вариантом белка или его фрагментом рутинным образом используют твердофазные иммуноанализы ELISA. См. Harlow and Lane, *supra*. Аффинность связывания может быть определена, например, анализом Скотчарда Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Анти-KIR-антитела обычно подвергают скринингу на способность модуляции активности NK-клеток, например, ингибированием NKCIK-опосредуемыми сигналами, стимулированием активации NK-клеток посредством NKCIK-опосредуемых сигналов. Были разработаны ряд анализов NK-клеток, которые могут быть использованы в таких контекстах, в том числе способы скрининга с использованием проточной цитометрии. См., например, McGinnes et al., *J Immunol Methods* 80 1984, 70-85. Способы, относящиеся к культивированию NK-клеток, оцениванию NK-клеток и т.п., известны в данной области. См., например, Campbell and Colonna, *Natural Killer Cell Protocols (Methods in Molecular Biology Series vol. 121)* (2000).

В контексте анти-NKCIK-антител, нейтрализующая NK-клетки активность может быть продемонстрирована способностью анти-NKCIK-антитела вновь восстановить лизис клеток-мишеней NKCIK-позитивными NK-клетками. Ассоциированная с анти-NKCIK-антителом модуляция NK-клеток (например, ингибирование KIR) может быть также оценена анализами цитотоксичности на основе различных клеток. Перенаправленное убивание является одной экспериментальной системой для определения способности рецептора NK-клеток индуцировать цитотоксичность. NK-клетки, покрытые антителом, специфическим для кандидатного рецептора, оценивают на их способность убивать клетки-мишени, которые экспрессируют Fc-рецептор, с которым связывается это антитело. В другом варианте осуществления модуляция активности NK-клеток, ассоциированная с анти-KIR-антителом, может оцениваться в анализе выделения цитокина. Другие биологические активности, ассоциированные с различными анти-NKCIK-антителами, также могут быть использованы для оценивания анти-NKCIK-антител. Например, анти-NKCIK-антитела могут оцениваться на их способность индуцировать, стимулировать и/или усиливать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), индуцируемую IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>3</sub> и некоторыми антителами подкласса IgG<sub>1</sub>, которые опосредуют ADCC. Способность индуцировать ADCC может оцениваться с использованием анализа с выделением хрома.

Анти-NKCIK-антитела обычно используют и обеспечивают, по меньшей мере, по существу, в чистой форме. По существу, чистая молекула является молекулой, которая является преобладающим видом в композиции, в которой она обнаружена, в отношении класса молекул, к которому она принадлежит (например, по существу, чистое антитело является преобладающим видом белка в композиции, в которой оно найдено. По существу, чистый вид составляет по меньшей мере приблизительно 50% этого типа молекулы в этой композиции и обычно будет составлять приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, или больший процент этого вида в композиции по массе. Обычно композиция, содержащая анти-NKCIK-антитело, будет обнаруживать по меньшей мере приблизительно 98%, 98% или 99% гомогенность в отношении анти-NKCIK-антител в контексте всех присутствующих видов пептидов в этой композиции или по меньшей мере в отношении вида пептида в контексте предлагаемого использования. Например, пептидный стабилизатор/буфер, такой как альбумин, может быть преднамеренно включен в конечную фармацевтическую композицию, без препятствования активности анти-NKCIK-антител, и, соответственно может быть исключен из таких расчетов чистоты. Присутствие загрязнений, которые не мешают фундаментальной активности, может быть приемлемым в контексте, по существу, чистой композиции. Чистота может измеряться способами, подходящими для конкретного соединения (например, хроматографическими способами, электрофорезом с агарозным и/или полиакриламидным гелем; ВЖХ-анализом и т.д.).

Выделенной молекулой называют молекулу, которая не ассоциирована со значительными уровнями (например, большими чем приблизительно 1%, большими чем 2%, большими чем приблизительно 5%) любых посторонних и нежелательных биологических молекул, таких как молекулы, не являющиеся молекулами анти-NKCIK-антитела, содержащимися в клетке, клеточной культуре, химических средах или животном, в котором было продуцировано это анти-NKCIK-антитело. Выделенной молекулой называют также любую молекулу, которая проходила через такую стадию чистоты вследствие вмешательства человека (автоматического или ручного, или обоих) в течение существенного периода времени (например, по меньшей мере приблизительно 10 мин, по меньшей мере приблизительно 20 мин, по меньшей мере приблизительно одного часа или более продолжительно). Во многих различных композициях, обеспеченных этим изобретением, например, в композиции, содержащей один или более фармацевтически приемлемых носителей, анти-NKCIK-антитело может присутствовать в относительно малых количествах относительно количества общих молекулярных частей в этой композиции (например, в случае композиции, содержащей большое количество фармацевтически приемлемого носителя, стабилизатора и/или консерванта). В некоторых случаях дополнительные пептиды, такие как БСА, могут быть включены в

такую композицию с предварительно очищенным анти-NKClR-антителом. Однако при условии, что такие дополнительные компоненты этой композиции являются приемлемыми для предполагаемого применения этого анти-NKClR-антитела, такая композиция может быть все еще описана как содержащая выделенное анти-NKClR-антитело. Другими словами, термин "выделенная" не означает исключение искусственных или синтетических смесей с другими соединениями или материалами, которые могут образовывать часть фармацевтически приемлемого препарата.

#### **Фармацевтически приемлемые носители**

Анти-NKClR-антитело может быть объединено с одним или несколькими носителями (разбавителями, эксципиентами и т.п.) и/или адьювантами, подходящими для одного или нескольких путей введения для обеспечения композиций, которые являются фармацевтически приемлемыми.

Анти-NKClR-антитела могут быть, например, смешаны с лактозой, сахарозой, порошками (например, порошком крахмала), эфирами целлюлозы алкановых кислот, стеариновой кислотой, тальком, стеаратом магния, оксидом магния, солями натрия и кальция фосфорной и серной кислот, аравийской камедью, желатином, альгинатом натрия, поливинилпирролидоном и/или поливиниловым спиртом, и, необязательно, таблетированы или инкапсулированы для общепринятого введения. Альтернативно, анти-NKClR-антитело может быть растворено в солевом растворе, воде, полиэтиленгликоле, пропиленгликоле, коллоидальных растворах карбоксиметилцеллюлозы, этаноле, кукурузном масле, арахисовом масле, хлопковом масле, кунжутном масле, трагакантовой камеди и/или различных буферах. Другие носители, адьюванты и способы введения хорошо известны в области фармацевтики. Носитель или разбавитель может включать в себя материал задержки времени, например глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, отдельно или с воском или другими функционально сходными материалами.

Фармацевтически приемлемые носители обычно включают в себя любые и все подходящие растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми с анти-NKClR-антителом. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают в себя воду, солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор, декстрозу, глицерин, этанол и т.п., а также комбинации любых из них. Во многих случаях, может быть желательным включение изотонических агентов, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит, сорбит или хлорид натрия, в такую композицию. Фармацевтически приемлемые вещества, такие как смачивающие агенты, или минорные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие агенты или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, которые, желательно, могут усиливать срок хранения или эффективность анти-NKClR-антитела, родственной композиции или комбинации. Пригодность для носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяют на основе отсутствия значимого отрицательного действия на желаемые биологические свойства этого антитела.

Композиции анти-NKClR-антител, родственные композиции и комбинации по данному изобретению могут находиться в различных подходящих формах. Такие формы могут включать в себя, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузируемые растворы), дисперсии или суспензии, эмульсии, микроэмульсии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы, дендримеры и другие наночастицы (см., например, Baek et al., *Methods Enzymol.* 2003; 362: 240-9; Nigavekar et al., *Pharm Res.* 2004 Mar; 21(3): 476-83), микрочастицы и суппозитории. Препараты и соли дополнительно описаны в РСТ Заявке № WO 2006/072625.

Обычно композиции в форме инъекционных или инфузируемых растворов, такие как композиции, сходные с композициями, используемыми для пассивной иммунизации людей другими антителами, используют для доставки анти-NKClR-антител этого изобретения. Типичным способом доставки композиций анти-NKClR-антител является парентеральное введение (например, внутривенное, подкожное, внутривенное и внутримышечное введение). В одном аспекте анти-NKClR-антитело вводят пациенту человеку внутривенной инфузией или инъекцией.

Композиция для фармацевтического применения может также включать в себя различные растворители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионогенный детергент, такой как Твин-80), стабилизаторы (например, сахара или свободные от белка аминокислоты), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для фармацевтического применения. Примеры подходящих компонентов описаны также, например, в Berge et al., *J. Pharm. Sci.*, 6661, 1-19 (1977); Wang and Hanson, *J. Parenteral. Sci. Tech.* 42, S4-S6 (1988); патентах США 6165779 и 6225289; и других документах, цитируемых здесь. Такая фармацевтическая композиция может также включать в себя консерванты, антиоксиданты или другие добавки, известные квалифицированным в данной области специалистам. Дополнительные фармацевтически приемлемые носители известны в данной области (см., например, ссылку в WO 2006/072625).

#### **Лечение гематологических злокачественных заболеваний**

Это изобретение обеспечивает терапевтические способы для лечения индивидуумов, имеющих или имевших гематологическое злокачественное заболевание или гематологическое предраковое состояние. Это лечение включает в себя анти-NKClR-антитела, композиции анти-NKClR-антител и/или родственные композиции, которые вводят индивидууму, имеющему минимальное или недетектируемое заболева-

ние. Это изобретение обеспечивает также предпочтительные терапевтические схемы для введения этих анти-NKCR-антител для такого лечения гематологических злокачественных заболеваний, в том числе лейкозов (например, AML, CML, MDS) и миелом (например, MM, SMM), и гематологических предраковых состояний, таких как MDS, SMM и MGUS.

Термин "лечение" относится здесь к доставке эффективного количества такого препарата с целью предотвращения любых симптомов или патологического состояния для развития или с целью предотвращения или задержки прогрессирования облегчения, ослабления или уничтожения уже развившихся подобных симптомов или патологических состояний. Термин "лечение" означает, следовательно, включение лечения минимального или недетектируемого заболевания в индивидууме, который (i) испытывал частичную реакцию или полную реакцию после первой терапии, (ii) находится в ремиссии, (iii) страдал от детектируемого заболевания (например, AML, MM, MDS), или (iv) имеет предраковое состояние. Таким образом, эти обсуждаемые лечения включают в себя лечение индивидуума, имеющего SMM или MGUS, но еще не имеющего MM. Дополнительно эти лечения включают в себя лечение индивидуума, имеющего MDS, но еще не имеющего AML. Термин "лечение (терапия)" включает в себя индукционную (стартовую) терапию и консолидационную (объединенную) терапию.

Термин "недетектируемое заболевание" относится в данном контексте к состоянию заболевания в индивидууме, при котором биологические и медицинские маркеры этого заболевания упали ниже цитологически детектируемого уровня. Например, говорят, что пациент, имеющий лейкоз, имеет "недетектируемое заболевание", когда этот пациент имеет общую отягощенность лейкозом ниже цитологически детектируемого уровня, т.е. приблизительно  $10^9$  клеток. В качестве дополнительного примера, говорят, что пациент, имеющий миелому, имеет "недетектируемое заболевание", когда имеется существенное отсутствие костного мозга или показателей крови множественной миеломы и/или не имеется данных о компонентах М-белка в сыворотке и моче. Эти биологические и/или медицинские маркеры заболевания могут оцениваться с использованием стандартных процедур. Например, уровни М-белка сыворотки и мочи могут оцениваться с использованием электрофореза и/или иммунофиксации.

В данном контексте термин "ремиссия" относится к частичному или полному исчезновению клинических и субъективных характеристик хронического или злокачественного заболевания.

Термины "гематологическое предраковое состояние" и/или "гематологические предраковые состояния" относятся в данном контексте к предраковым клеткам. Эти предраковые клетки еще не являются злокачественными, но находятся под угрозой стать злокачественными. Предраковые клетки могут выглядеть не такими, как нормальные клетки, но они еще не внедряются в окружающую ткань. Примерные предраковые состояния включают в себя, но не ограничиваются ими MDS, SMM и MGUS.

Термин "гематологические злокачественные заболевания" включает в себя здесь лимфомные, лейкозные, миеломные или лимфоидные злокачественные заболевания, а также рак селезенки и лимфатических узлов. Примерные лимфомы включают в себя как В-клеточную лимфому, так и Т-клеточную лимфому. Неограничивающие примеры В-клеточных лимфом включают в себя как низкодифференцированную NHL фолликулярную лимфому (FCC), мантийно-клеточную лимфому (MCL), диффузную крупноклеточную лимфому (DLCL), мелкоклеточную лимфоцитарную (SL) NHL, фолликулярную NHL промежуточной степени дифференцировки, высокодифференцированную диффузную NHL, иммунобластную высокодифференцированную NHL, высокодифференцированную мелкоклеточную с нерасщепленными клетками NHL, генерализованное заболевание NHL, макроглобулинемию Вальденстрема, лимфопластцитоидную лимфому (LPL), мантийно-клеточную лимфому (MCL), фолликулярную лимфому (FL), диффузную крупноклеточную лимфому (DLCL), лимфому Беркитта (BL), СПИД-ассоциированные лимфомы, моноцитарную В-клеточную лимфому, ангиоиммунобластную лимфоаденопатию, мелкоклеточную лимфоцитарную, фолликулярную, диффузную крупноклеточную, диффузную недифференцированную мелкоклеточную, диффузную недифференцированную мелкоклеточную, иммунобластную крупноклеточную лимфобластому, недифференцированную, Беркитта и не-Беркита, фолликулярную, преимущественно крупноклеточную; фолликулярную, преимущественно мелкоклеточную недифференцированную и фолликулярную смешанно-клеточную недифференцированную мелкоклеточную и крупноклеточную лимфомы. Неограничивающие примеры Т-клеточных лимфом включают в себя экстралимфатическую Т-клеточную лимфому, Т-клеточные лимфомы кожи, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому. Гематологические злокачественные заболевания включают в себя также лейкоз, например, но не только, вторичный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый миелогенный лейкоз (AML), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (B-PLL), острый лимфобластный лейкоз (ALL) и миелодисплазию (MDS). Гематологические злокачественные заболевания дополнительно включают в себя миеломы, такие как, но не ограничивающиеся ими, множественная миелома (MM) и тлеющая (вяло текущая) множественная миелома (SMM). Другие гематологические и В-клетка-ассоциированные или Т-клетка-ассоциированные типы рака включены в термин гематологического злокачественного заболевания. Например, гематологические злокачественные заболевания также включают в себя раковые заболевания дополнительных гемопоэтических клеток, включающих в себя дендритные клетки, тромбоциты, эритроциты, природные клетки-киллеры и полиморфонуклеарные лейкоциты, например, базофилы, эозинофилы, нейтрофилы и моноциты.

Квалифицированным в данной области специалистам должно быть понятно, что эти предраковые состояния и злокачественные состояния будут часто иметь различные названия вследствие изменяющихся систем классификации и что пациенты, имеющие лимфомы, классифицированные под разными названиями, могут также выиграть из объединенных терапевтических схем введения доз лекарственных средств данного изобретения.

В одном примерном аспекте это изобретение обеспечивает способ уменьшения прогрессирования гематологического злокачественного заболевания в млекопитающем-хозяине, таком как пациент-человек, имеющий детектируемый уровень раковых клеток, предусматривающий введение анти-NKClR-антитела, композиции анти-NKClR-антител или родственной композиции (например, нуклеиновой кислоты, кодирующей анти-NKClR-антитело), в количестве, достаточном для детектированного уменьшения прогрессирования гематологических злокачественных заболеваний в этом хозяине.

Заболевание или прогрессирование рака может определяться стандартными критериями для конкретного типа заболевания. Прогрессирование иногда определяют оцениванием селективного клонального размножения инициированных клеток. Способы детектирования рака и прогрессирования рака могут достигаться любым подходящим способом, несколько примеров которых известны в данной области. Примеры подходящих способов включают в себя ПЦР и ОТ-ПЦР (например, ассоциированные с раковыми клетками генами или "маркерами"), биопсию, визуализирующие способы, кариотипирование и другой хромосомный анализ, способы иммуноанализа/иммуоцитохимического детектирования, гистологические и/или гистопатологические анализы, кинетические исследования клеток и анализ клеточного цикла, проточную цитометрию и физические способы исследования, например, для физических симптомов). Примерные способы для детектирования рака и прогрессирования рака включают в себя детектирование цитогенетических аберраций, например, неопластических генетических маркеров, выделением популяции аномальных клеток, выделением нуклеиновой кислоты из этих аномальных клеток и приведением этой выделенной нуклеиновой кислоты в контакт одним или несколькими олигонуклеотидами, которые направлены на генетическую реарранжировку. Это приведение в контакт детектирует присутствие цитогенетической аберрации, такой как реарранжировка гена Иммуноглобулина (Ig) и/или Т-клеточного рецептора.

Доставка анти-NKClR-антител в субъекта (либо прямым введением, либо экспрессией из нуклеиновой кислоты в нем, например, из вектора переноса поксивирусного гена, содержащего последовательность (последовательности), нуклеиновой кислоты, кодирующей анти-NKClR-антитело, и применение других способов этого изобретения, могут быть использованы для уменьшения, лечения, предотвращения или улучшения иным образом любого подходящего аспекта прогрессирования рака. Способы этого изобретения могут быть особенно полезными в уменьшении и/или ослаблении роста опухолей (например, процента плазматических клеток в костном мозге, количества опухолевых клеток в кровотоке) и любого параметра или симптома, ассоциированного с ними (например, уровнем М-белка). Способы, которые уменьшают, предотвращают или иным образом улучшают такие аспекты прогрессирования рака, независимо или сообща, являются ценными признаками этого изобретения.

Уменьшение прогрессирования рака может включать в себя, например, любое детектируемое уменьшение (1) степени нормальных клеток, превращающихся в неопластические клетки (или любого аспекта этого превращения), (2) степени пролиферации предраковых (например, SMM или MGUS) или неопластических клеток, (3) количества клеток, проявляющих предраковый и/или неопластический фенотип, (4) физической площади клеточной среды (например, культуры клеток, ткани или органа (например, органа в млекопитающем-хозяине)), содержащем предраковые и/или неопластические клетки, (5) вероятности, что нормальные клетки и/или предраковые клетки будут превращаться в неопластические клетки, (6) вероятности, что раковые клетки будут прогрессировать к следующему аспекту прогрессирования рака (например, уменьшения метастатического потенциала), или (7) их любой комбинации. Такие изменения могут быть детектированы с использованием любых вышеописанных способов или их подходящих копий, известных в данной области, которые обычно используют в подходящее время перед введением терапевтической схемы введения лекарственных средств для достижения эффективности.

В другом аспекте это изобретение обеспечивает способ уменьшения риска прогрессирования рака, уменьшения риска дополнительного прогрессирования рака в клеточной популяции, которая подверглась иницированию, и обеспечения терапевтической схемы введения лекарственных средств для уменьшения прогрессирования рака в пациенте-человеке, который предусматривает введение этому пациенту одной или нескольких первых терапий (например, стартовой (первоначальной) терапии, такой как химиотерапевтический агент) в количестве и при схеме введения, достаточных для достижения частичной или полной реакции, и введение количества анти-KlR-антитела или родственной композиции (или применение способа комбинированного введения) этому пациенту. Это анти-NKClR-антитело вводят при продолжающейся реакции пациента на первую обработку, например, когда этот пациент находится в ремиссии или имеет минимальное заболевание.

Анти-NKClR-соединения могут вводиться в виде монотерапевтического агента или в комбинации с другими терапевтическими агентами. Термин "монотерапевтический агент" относится в данном контексте к лекарственному средству, содержащему анти-NKClR-соединение, являющемуся свободным от лю-

бых других фармацевтически активных агентов, и/или дополнительные фармацевтически активные агенты не используются для лечения этого индивидуума для этого конкретного состояния заболевания. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления этого изобретения введение анти-NKCIK-антитела или фрагмента антитела может комбинироваться с другими терапевтическими агентами. Например, ряд терапевтических агентов является доступным для лечения рака. Композиции антител и способы лечения данного изобретения могут объединяться с любыми другими способами, обычно применяемыми в лечении конкретного заболевания, в частности опухоли, ракового заболевания или другого заболевания или нарушения, которое проявляет этот пациент. Пока неизвестно, что конкретный терапевтический подход сам по себе является вредным для состояния пациента, и этот подход не препятствует значимо активности этого антитела в фармацевтической композиции этого изобретения, предполагается его комбинирование с данным изобретением.

В связи с лечением рака фармацевтическая композиция данного изобретения может быть использована в комбинации с классическими подходами, такими как хирургия, лучевая терапия, химиотерапия и т.п. Таким образом, это изобретение обеспечивает комбинированные терапии, в которых фармацевтическую композицию этого изобретения используют одновременно с хирургией, до или после хирургии; или вводят пациентам с общепринятыми химиотерапевтическими, радиотерапевтическими или антиангиогенными агентами или перед ними или после них, или нацеленными иммунотоксинами или коагулигандами. Другие противораковые агенты могут вводиться до, одновременно или после введения композиции анти-NKCIK-антитела этого изобретения. В некоторых ситуациях может быть даже желательным значительное удлинение периода времени для лечения, где пропускают несколько дней (например, 2, 3, 4, 5, 6 или 7), несколько недель (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) или даже несколько месяцев (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) между соответствующим введением противоракового агента или противораковой терапии и введением антитела этого изобретения. Это может быть выгодным в обстоятельствах, в которых противораковая терапия предназначалась для разрушения опухоли, например хирургия или химиотерапия, и введение композиции антитела этого изобретения предназначалась для предотвращения метастазирования или повторного роста опухоли. Ожидается также, что будет использоваться более чем одно введение либо композиции на основе анти-NKCIK-антитела этого изобретения, либо противоракового агента. Эти агенты могут вводиться взаимозаменяемо в чередующиеся дни или недели; или в цикле обработки композицией анти-NKCIK-антитела с последующим циклом противораковой терапии. В любом случае для достижения регрессии опухоли с использованием комбинированной терапии, всем, что требуется, является доставка обоих агентов в комбинированном количестве, эффективном для проявления противоракового эффекта, независимо от времени введения.

Для применения на практике комбинированной противораковой терапии, можно было бы просто вводить пациенту композицию антитела этого изобретения в комбинации с другим противораковым агентом способом, эффективным для получения их выгодных комбинированных противораковых действий в пациенте. При использовании одного или нескольких агентов в комбинации с антителосодержащей композицией этого изобретения в терапевтической схеме введения, не требуется, чтобы комбинированные результаты были аддитивными эффектами, наблюдаемыми, когда каждая терапия проводится отдельно. Хотя, по меньшей мере, аддитивные эффекты являются в общем желательными, любой увеличенный противораковый эффект, превышающий эффект одной из отдельных терапий, был бы полезным. Кроме того, нет конкретного требования, чтобы эта комбинированная терапия проявляла синергические эффекты, хотя это является возможным и благоприятным.

Комбинированное введение включает в себя совместное введение отдельных препаратов или единственного фармацевтического препарата и последующего введения анти-NKCIK-антитела или фрагмента антитела и первой терапии в любом порядке. Предпочтительно все вводимые активные агенты одновременно проявляют их биологические активности.

В зависимости от пациента и стадии рака первая терапия может включать в себя один или более из следующих агентов и/или терапий: хирургии, лучевой терапии, иммуномодулирующих агентов, химиотерапевтических агентов, гормональной терапии и антиангиогенных агентов. Может быть также желательным комбинированное введение анти-NKCIK-антитела или фрагментов антитела с введением другого антитела, например, антитела, направленного против другого опухолевого антигена, ассоциированного с этим конкретным раком. Например, анти-NKCIK-антитело или фрагменты антитела могут вводиться в комбинации с Ритуксаном.

Что касается хирургии, любое хирургическое вмешательство может практиковаться в комбинации с данным изобретением.

В связи с радиотерапией предполагается любой механизм для индуцирования повреждения ДНК локально в раковых клетках, такой как гамма-излучение, рентгеновское облучение, УФ-облучение, микроволны и даже испускания электронов и т.п. Обсуждается также прямая доставка радиоизотопов в раковые клетки, и это может быть использовано вместе с нацеливающим антителом или другими нацеливающими агентами.

В других аспектах иммуномодулирующие агенты или схемы введения лекарственных средств могут вводиться в комбинации с композициями антител данного изобретения или в виде части композиций

антител данного изобретения. Предпочтительные примеры иммуномодулирующих агентов включают в себя цитокины. В таких комбинированных подходах могут быть использованы различные цитокины. Примеры цитокинов, применимых в этих комбинациях, включают в себя IL- $\alpha$ , IL-1-бета, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, TGF- $\beta$ , GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ . Цитокины, используемые в комбинированном лечении, или композиции этого изобретения вводят в соответствии со стандартными схемами лекарственного лечения, согласующимися с клиническими показаниями, такими как состояние пациента и относительная токсичность цитокина. Другие иммуномодуляторные соединения, которые могут вводиться в комбинации с композициями антител данного изобретения или в виде части композиций антител данного изобретения, включают в себя антитела, которые связываются специфически с другими ингибирующими рецепторами на лимфоцитах, включающие в себя, без ограничения, такие антитела, как анти-CTLA4-антитела или анти-CD94JNKG2A-антитела (см., например, опубликованную заявку на патент США 20030095965). Варианты и производные этих молекул, которые известны в данной области, также или альтернативно могут быть использованы в таких способах и включены в композиции этого изобретения, в случае необходимости.

В некоторых вариантах осуществления содержащие анти-NKClR-антитела терапевтические композиции данного изобретения могут вводиться в комбинации с агентом химиотерапевтической или гормональной терапии или могут дополнительно содержать агент химиотерапевтической или гормональной терапии. Разнообразные агенты гормональной терапии и химиотерапевтические агенты могут быть использованы в способах комбинированной терапии, описанных здесь.

Примерные химиотерапевтические агенты включают в себя, но не ограничиваются ими, ацетогенины (например, буллатоцин и буллатацинон), адриамицин, алкилирующие агенты, алкилсульфонаты, азиридины (например, бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа), бисфосфонаты (например, клодронат, этидронат, NE-58095, золедроновую кислоту/золедронат, алендронат, памидронат, тилудронат и ризедронат); дактиномицин, дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол), этиленимины и метиламеламины (например, алтретамин, триэтиденмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломомеланин), бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (например, топотекан, ирнотекан, ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистагин; СС-1065 (например, адозелезин, карзелезин и синтетические аналоги бизелезина); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (например, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (например, KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкратистатин; сарколистин; спонгистатин; азотные аналоги горчичного газа (иприты) (например, хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлорэтаминоксида гидрохлорид, мелфалан, новембицин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид и урацилпиприт); нитрозуреазы (например, кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин); антибиотики, такие как энединновые антибиотики, (например, калихеамицин); динемидин; эсперамицин; хромофор неокарцинонстатин и хромопротеиновые энединновые антибиотики (например, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, каминомицин, карцинофиллин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорибицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловую кислоту, ногаломицин, оливомицины, пелломицин, потфирамицин, пуромицин, квелиамицин, родорубицин, стрептомицин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин и зорубицин); антиметаболиты (например, метотрексат, и 5-фторурацил (5-FU)); аналоги фолиевой кислоты (например, деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат); аналоги пурина (например, флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин); андрогены (например, калуостерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан и тестостерон); анти-адренали (например, аминоклотеимид, митотан и трилостан); наполнитель фолиевой кислоты (например, фролиновую кислоту); ацеглатон; альдлфосфамида гликозид; аминоклевуленовую кислоту; эниурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглуцид; галлия нитрат; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтансиноиды (например, майтансин и ансамитоцины); митоквазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентастатин; фенамет; пирарубин; лозооксатрон; 2-этилгидразид; прокарбозин; полисахарид К; разоксан; ризоксин; сизофуан; спирогерманий; теназуоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотечены (например, Т-2-токсин, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитосин; арабинозид ("Ага-С"); тиотепа; таксоиды (например, таксол, таксотере, паклитаксел и доксетаксел); хлоранбутил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины (например, цисплатин и карбоплатин); винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; оксалиплатин; лейковолин; винорелбин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминокптерин; ибанронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды (например, ретиноевую кислоту); капецитабин и фармацевтически приемлемые со-

ли, кислоты и производные любого из вышеуказанных химиотерапевтических агентов.

Как будет понятно специалистам с обычной квалификацией в данной области, подходящие дозы химиотерапевтических агентов, используемых в комбинации с ингибирующим NKCIK агентом, например анти-KIK-антителом, будут приближаться к дозам, уже используемым в клинических терапиях, включающих в себя введение химиотерапевтического агента, одного или в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами. Варьирование в дозе будет, вероятно, осуществляться в зависимости от подлежащего лечению состояния. Лечащий врач, проводящий введение, будет способен определить подходящую дозу для отдельного субъекта.

Антигормональные агенты действуют для регулирования, уменьшения, блокирования или ингибирования эффектов гормонов, которые могут стимулировать рост рака. Как упоминалось выше, ингибирующие NKCIK агенты, например, анти-NKCIK-антитела, данного изобретения могут быть использованы в комбинации с антигормональными агентами. Примерные антигормональные агенты включают в себя, но не ограничиваются ими, агонисты LHRH (например, лейпрорелин, гoserелин, трипторелин и бусерелин); антиэстрогены и селективные модуляторы эстрогена (SERM) (например, тамоксифен, ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен); понижающие регуляторы рецептора эстрогена (ERD); антиандрогены (например, флутамид, нилутамид, ципротерон и бикалутамид); ингибиторы ароматазы (например, анастразол, экземестан, летрозол, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, мегестрола ацетат, форместан, ворозол и фадрозол); и прогестагены (например, медрокси, хлормадион и мегестрол).

Данные ингибирующие NKCIK агенты, например анти-KIK-антитела, этого изобретения могут быть использованы в комбинации с любым одним или несколькими антиангиогенными терапиями или могут дополнительно содержать антиангиогенные агенты. Неограничивающие примеры антиангиогенных агентов включают в себя нейтрализующие антитела, бессмысловую РНК, siRNA, RNAi, РНК-аптамеры и рибозимы, в частности такие, которые ингибируют экспрессию генов в путях передачи сигналов, предположительно участвующих в пролиферации отклоняющихся от нормы (аберрантных) клеток, таких как, например, PKC-альфа, Raf, H-Ras, EGF-R, VEGF или VEGF-R.

Схема введения лекарственного средства и дозы этих вышеупомянутых химиотерапевтических лекарственных средств, которые являются терапевтически активными, будут зависеть от конкретного подлежащего лечению рака, степени заболевания и других факторов, известных лечащему врачу с квалификацией в данной области, и могут быть определены лечащим врачом.

В следующем аспекте это изобретение обеспечивает способ стимуляции ремиссии рака в млекопитающем-хозяине, таком как пациент-человек, предусматривающий введение композиции, содержащей анти-NKCIK-антитело, такое как анти-KIK-антитело, хозяину для стимуляции ремиссии рака в этом хозяине.

В следующем аспекте, это изобретение обеспечивает способ уменьшения риска развития ракового состояния, уменьшения времени появления ракового состояния, уменьшения тяжести рака, диагностируемого в ранних стадиях и/или уменьшения пораженной площади рака после его развития в млекопитающем-хозяине, предусматривающий введение хозяину профилактически эффективного количества анти-NKCIK-антитела или родственной композиции этого изобретения таким образом, что достигается желаемый физиологический эффект (физиологические эффекты).

Предпочтительно этот хозяин имеет MDS, SMM или MGUS, и раковым состоянием является MM, где это анти-NKCIK-антитело уменьшает риск развития MM и/или уменьшает время появления MM.

Количество NK-клеток и маркеров активации заметно увеличивается в пациентах с SMM. Обычно индивидуумы, имеющие SMM, будут пациентами, не лечеными первой терапией перед лечением соединением, например антителом, которое связывает NKCIK; однако это изобретение рассматривает также пациентов с SMM, имевших ранее лечение агентом, не являющимся NKCIK-агентом.

Без связывания теорией, считается, что способы этого изобретения являются наиболее эффективными при использовании в индивидууме, имеющем минимальное заболевание, в сравнении с пациентом, имеющим высокую опухолевую массу, так как эти способы являются не особенно подходящими для восстановления функции NK-клеток в индивидуумах с признаками и симптомами заболевания. Вследствие этого в некоторых вариантах осуществления, включающих в себя патологии, другие, чем предраковые состояния, такие как SMM или MGUS, этого пациента лечат с использованием стартовой (первоначальной) терапии, так что этот индивидуум имеет минимальное или недектируемое заболевание. Например, лечение стартовой терапией и необязательно консолидационной (объединенной) терапией может приводить к ремиссии заболевания или полной реакции, усиливая эффективность способов этого изобретения.

В следующем аспекте это изобретение обеспечивает способ увеличения вероятности выживания, превосходящей релевантный период в пациенте-человеке с диагнозом рака. В другом аспекте это изобретение обеспечивает способ улучшения качества жизни ракового пациента, предусматривающий введение этому пациенту композиции этого изобретения в количестве, эффективном для улучшения его качества жизни. В следующем аспекте описанные здесь способы этого изобретения могут применяться для значимого уменьшения количества раковых клеток в позвоночном хозяине, так что, например, общее количество опухолевых клеток уменьшается. В родственном смысле, это изобретение обеспечивает способ уби-

вания предраковых клеток и/или раковых клеток в позвоночном, таком как пациент-человек, имеющий рак. Необязательно, этот рак является гематологическим злокачественным состоянием, выбранным из группы, состоящей из AML, CML, MM, SMM и MGUS.

В другом аспекте это изобретение обеспечивает применение соединения, которое ингибирует NKClR, для приготовления фармацевтической композиции для лечения индивидуума, имеющего или имевшего ранее гематологическое предраковое состояние или гематологическое раковое состояние. В одном варианте этого применения этот индивидуум имеет минимальное или недектируемое заболевание. В другом варианте этот индивидуум имеет гематологическое предраковое состояние. В следующем варианте этот индивидуум имеет SMM (тлеющую миелому), MGUS (моноклональную гаммапатию неопределенной значимости) или MDS (Миелодиспластический Синдром).

Это изобретение обеспечивает также соединение, которое ингибирует NKClR, для применения в лечении индивидуума, имеющего или имевшего ранее гематологическое предраковое состояние или гематологическое раковое заболевание.

### **Острый миелоидный лейкоз**

Острый миелоидный лейкоз (AML) является одним из наиболее частых типов лейкоза среди взрослых в Соединенных Штатах и Европе. Приблизительно 11930 новых случаев AML оценивались как диагностированные в США в 2006 г., с результатом менее 1% от всех случаев рака и 34% от всех случаев лейкоза. Встречаемость AML является низкой при возрасте ниже 40 лет, но увеличивается прогрессивно с возрастом, от приблизительно 1 на 100000 при возрасте 40 до более 15 на 100000 при возрасте 75 лет или более. Медианный возраст пациента для презентации AML равен 65-70 лет. Успешное лечение является значительно менее обычным в пожилых пациентах с AML, чем в молодых пациентах. Для пожилых пациентов, с возрастом 55-65 лет или старше, медианное время от лечения (стартовой химиотерапии) до смерти равно 5-10 месяцев. Хотя степени полной ремиссии равны приблизительно 50%, эти ремиссии обычно являются транзиторными и редко длятся более 12 месяцев. Вероятность пребывания в ремиссии 3 года после стартовой химиотерапии равна менее 10%.

Ассоциированные с возрастом различия в конечных исходах связаны с ко-заболеваниями и прогностическими факторами. Многие пожилые пациенты не способны переносить стандартное лечение цитотоксическими агентами и их осложнения. Пациенты со связанными с возрастом хроническими сердечными, легочными, печеночными или почечными нарушениями находятся при более высоком риске острой токсичности от химиотерапии.

Аномальные кариотипические признаки являются обычными в AML. Важность кариотипа в определении патофизиологии, патогенеза и реакции на терапию в случае острого лейкоза является ключевой концепцией. Цитогенетические аберрации (отклонения от нормы) наиболее часто ассоциированные с неуспехом лечения у молодых пациентов с AML (например, аномалии хромосомы 5 или 7 или комплексных кариотипов), считаются более обычными у пожилых пациентов, встречающимися у 32-57% пациентов. В отличие от этого "благоприятные" цитогенетические аномалии, такие как t(8;21), t(15;17) или inv(16), являются более обычными у более молодых пациентов и являются ответственными частично за их лучшее, не сопровождающееся болезнями, выживание. Некоторые биомаркеры прогрессирования заболевания, которые обычно используются в AML, включают в себя мутации в FLT3 и/или мутации NPM1 - два наиболее важных прогностических биомаркера для кариотип-нормального AML. FLT3 является обычно единственным наиболее важным прогностическим фактором в AML. Приблизительно 25-35% пациентов с AML имеют мутацию FLT3. Пациенты с мутациями FLT3 имеют худший исход и худшую реакцию на стандартную химиотерапию.

### **Современное лечение AML**

Терапевтическая стратегия для большинства пациентов с AML была разделена на две генерализованные фазы: индукционную (стартовую) терапию и пост-ремиссионную терапию, показанные на фиг. 1.

#### **Индукционная (стартовая) терапия**

Первой задачей терапии в случае AML является индуцирование полной ремиссии (CR). AML взрослых в ремиссии определяется как нормальное количество клеток периферической крови и нормальный костный мозг с менее чем 5% незрелых (бластных клеток) в костном мозге и отсутствие признаков или симптомов этого заболевания. Кроме того, не имеется признаков или симптомов лейкоза центральной нервной системы или другой экстрамедуллярной инфильтрации.

Стартовая терапия нацелена на уменьшение общей отягощенности лейкозом ниже цитологически детектируемого уровня приблизительно  $10^9$  клеток. Предпосылкой для достижения полной ремиссии является достижение аплазии, длящейся обычно 1 или 2 недели после стартовой химиотерапии. Однако во время полной ремиссии пациенты все еще имеют остающуюся значимую, но едва детектируемую лейкозную массу (минимальное остаточное заболевание), требующую некоторой формы пост-ремиссионной терапии.

В течение более чем 20 лет стандартная стартовая химиотерапия включала в себя антрациклин и цитарабин. Наиболее обычная схема введения объединяла 3 дня даунорубина с 7 днями непрерывной инфузии цитарабина (схема 3+7). В наиболее перспективных исследованиях, использующих эту схему, полная ремиссия (CR) достигается у 65-75% пациентов с возрастом, меньшим чем 60 лет, и приблизи-

тельно 50% пациентов старше 60 лет. Уменьшенная вероятность получения CR среди старых пациентов является результатом увеличенного риска устойчивого заболевания, а также увеличенного риска смерти от осложнений панцитопении. Другие факторы, ассоциированные с более низкой степенью CR после стартовой терапии, включают в себя присутствие неблагоприятной цитогенетики, предыдущие гематологические нарушения и статус низкой работоспособности при диагностировании.

При условии относительно низкой степени реакции на стандартную терапию у пожилых пациентов была предпринята попытка применения схем стартовой терапии с интенсификацией дозы. Однако до сих пор ни одна стартовая схема не оказалась превосходящей схему 3+7 в отношении степеней ремиссии или смертности.

#### **Постремиссионная терапия**

Постремиссионная терапия нацелена на дополнительное уменьшение количества оставшихся лейкозных клеток, которое может быть таким высоким, как  $10^8$ - $10^9$  клеток при первоначальной CR. Это может достигаться либо цитотоксической химиотерапией, вызывающей значимые миелосупрессии, либо заменой стволовых клеток пациента посредством аллогенной трансплантации.

У пожилых пациентов, представляющих наибольшую долю популяции AML, химиотерапия с лечебным намерением не является выбором с благоприятным профилем риск-польза, однако консолидационная (объединенная) химиотерапия обычно предоставляется пожилым пациентам. Интенсифицированные консолидационные или поддерживающие схемы введения доз для пожилых пациентов с AML тестировали в клинических испытаниях, но они не оказались благоприятными. Это обусловлено в основном связанными с химиотерапией токсичностями в комбинации со связанными с возрастом пациента совместными заболеваниями (ко-заболеваниями). Таким образом, пациенты, которые страдают от значительных уменьшений в их статусе работоспособности или от значительной токсичности для органов в корреляции со стартовой химиотерапией, не будут кандидатами для интенсифицированной постремиссионной терапии.

#### **Лечение AML анти-NKCR-соединениями**

Анти-NKCR-соединения могут вводиться выгодным образом в качестве постремиссионной терапии. Например, пациенты, достигшие CR в ответ на предыдущую терапию, например после стартовой терапии и, необязательно, консолидационной терапии, могут лечиться анти-NKCR-антителами в соответствии с дозами и схемами введения лекарственных средств, описанными здесь. В одном варианте этот пациент имеет плохой прогноз (например, находится в группе, имеющей высокий риск прогрессирования), например, пациент имеет мутацию FLT3 или Npm1, ассоциированные с плохим прогнозом. Лечение при помощи анти-NKCR-антитела может быть лечением монотерапевтическим агентом или лечением в комбинации с другими агентами, используемыми в лечении этого заболевания. Однако, предпочтительно, анти-NKCR-антитела будут вводиться без загрязняющего применения химиотерапевтических агентов, которые оказывают отрицательное действие на активность NK-клеток.

#### **Тлеющая множественная миелома (SMM)**

Тлеющая множественная миелома определена с 2003 года с использованием международных консенсусных критериев (International Myeloma Working Group. Критерии для классификации моноклональных гаммапатий, множественной миеломы и родственных нарушений являются следующими: отчет из International Myeloma Working Group. Br J Haematol 2003; 121: 749-57):сывороточный моноклональный белок 3 г/дл или выше, и/или 10% или более плазматических клеток в костном мозге, но отсутствие доказательства нарушения родственного органа или родственной ткани (нет конечного повреждения органа, в том числе повреждений костей), а также родственных симптомов.

Группа Mayo Clinic улучшила эти критерии для выяснения, что пациенты только с бессывороточными цепями должны быть исключены и что плазматические клетки должны быть клональными (Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. Leukemia 2009; 23: 3-9).

#### **Современное лечение SMM**

В настоящее время нет доступной терапии SMM. Современный подход к лечению этого медицинского состояния ограничивается внимательным наблюдением, дающим возможность диагностировать раннее прогрессирование в активную MM, заслуживающую лечения. Пациенты должны наблюдаться каждые 3 месяца во время первого года для установления паттерна эволюции. Менее частые наблюдения могли бы рассматриваться в неэволюционирующих пациентах со стабильным M-белком и низким риском прогрессирования, в соответствии с прогностическими критериями Kyle (Blade J et al., J Clin Oncol 2010 28: 690-97).

Преобладание SMM увеличивается с возрастом, средний возраст пациентов в диагностике находится в диапазонах от 65 до 70 лет. SMM является ответственным за приблизительно 15% всех случаев с новодиагностированными MM. При условии приближенной встречаемости MM в США, среди 20000 новых случаев в год, не более чем 3000 новых случаев SMM могли бы диагностироваться в США каждый год. Однако большинство SMM в настоящее время не диагностированы, причем фактически всем MM, по-видимому, предшествовали SMM, как обсуждается ниже.

Конвергентные данные предполагают, что NK-клетка участвует в иммунологическом надзоре (кон-

троле) ММ, в том числе данные *ex vivo* показавшие, что активированные НК-клетки являются цитотоксичными против злокачественных клеток, полученных из ММ. На ранней стадии миеломные клетки этого заболевания в широком объеме экспрессируют вышеупомянутые активирующие НК-лиганды ((MICA и B, ULBP) и понижающим образом регулируют ингибирующий HLA класса I лиганд (Carbone E et al., Blood 2005; 105: 251-58). Кроме того, прогрессирование низкой опухолевой массы идет параллельно с количественным снижением и функциональным истощением НК-клеток. Количество НК-клеток и маркеры активации заметно увеличиваются в пациентах с MGUS, а также длящейся или ранней ММ. В противоположность этому количество НК-клеток снижается и НК-клетки становятся гипореагирующими на стимуляцию в пациентах с запущенной ММ (Carbone et al., 2005; Sawanobori M et al., Acta Haematol 1997; 98: 150-54).

Два недавних исследования предполагают, что всем ММ предшествуют бессимптомная моноклональная гаммапатия неизвестной значимости (MGUS), характеризующаяся как сывороточным М-белком <3 г/дл, так и плазматическими клетками костного мозга <10%. Однако только половина пациентов MGUS прогрессируют и в этом случае увеличение в М-белке является постепенным, приводя, вероятно, к SMM перед явным ММ. Патофизиология этих пролифераций плазматических клеток и механизм, участвующий в прогрессировании из MGUS в SMM и SMM в симптоматическую ММ, являются далекими от полного понимания. Однако 2 основные стадии нескольких ударных моментов патогенного процесса были хорошо охарактеризованы:

Первоначально ограниченная трансформация клональных плазматических клеток, которая происходит из приобретенных генетических событий. Плазматические клетки MGUS, SMM имеют генетические и фенотипические профили, сходные с профилями миеломатозных клеток, отличающие их ясно от их нормальной копии.

Постепенное прогрессирование MGUS в SMM и SMM в ММ, которое, по-видимому, связано не только с генетическими событиями, встречающимися в неопластических плазматических клетках, но также с накоплением изменений в микроокружении костного мозга.

Патогенез был хорошо описан в когорте из 276 пациентов с SMM, прослеженной группой Kyle et al., с заключением.

Кумулятивная вероятность прогрессирования в симптоматические и неизлечимые злокачественные состояния была 73% при 5 годах. Большинство из этих пациентов развивали ММ, тогда как только 2% прогрессировали в первичный амилоидоз (AL).

На общий риск прогрессирования в SMM в сильной степени влияло время после установления диагноза. Он был приблизительно 10% в первые 5 лет, но только 3% в год в течение следующих 5 лет с уменьшением до 1% в год после этого. Среднее (медианное) время прогрессирования (TTP) находилось в диапазоне 2-3 лет.

На риск прогрессирования в сильной степени влиял уровень моноклонального белка, доля плазматических клеток костного мозга или и то, и другое. Как показано ниже, имелись существенные различия в среднем (медианном) времени прогрессирования между 3 прогностическими группами, созданными с использованием этих 2 переменных. В группе высокого риска 87% прогрессировали до явных злокачественных состояний при 15 годах, и среднее (медианное) время прогрессирования было таким коротким, как 2 года. В противоположность этому в группе низкого риска только 39% субъектов прогрессировали со средним временем 19 лет.

Таблица 2

Время до прогрессирования	Количество пациентов (n %)	Медиана (лет)	Прогрессирование при 15 годах (%)
<b>Группа 1</b> Спайк сывороточной M $\geq$ 3 г/дл ВМРС $\geq$ 10%	106 (38%)	2	87
<b>Группа 2</b> Спайк сывороточного M<3 г/дл ВМРС $\geq$ 10%	143 (52%)	8	70
<b>Группа 3</b> Спайк сывороточного M $\geq$ 3 г/дл ВМРС<10%	27 (10%)	19	39
<b>Общая популяция</b> P<0,001 n многомерного анализа	276 (100%)	5	73

Табл. 2 показывает вероятность прогрессирования в активную множественную миелому (из Kyle RA et al., N Engl J Med 2007; 356: 2582-90).

Другие факторы прогрессирования были идентифицированы в дополнительных исследованиях и упомянуты в таблице ниже. Недавние данные особо выдвигают на первый план важность 2 иммунологических прогностических факторов (предикторов), которые могут улучшать прогнозирование SMM:

Не имеющая аномалий степень легких цепей (FLC) в точках разрыва, меньшая чем 0,126, или большая чем 8, является, по-видимому, независимым фактором риска. Как показано работой с одной и той же когортой Mayo, включение FLC приводило к улучшенной классификации с более сбалансированным распределением пациентов, в сравнении с первоначальной классификацией, которая принимала во внимание только уровни сывороточного M-белка и процент плазматических клеток костного мозга.

Аберрантный фенотип плазматических клеток костного мозга ВМРС, и, как также показано в более старых исследованиях, так называемый иммунопарез, определяемый как уменьшение в одном или двух не участвующих изотипах Ig. На основании этих 2 параметров, была предложена система оценивания с аккумулятивным прогрессированием SMM в MM 4, 46 и 72%, когда присутствовали 0, 1 или 2 фактора соответственно. Однако характеристика фенотипа ВМРС проточной цитометрией остается громоздкой и потенциально трудной для воспроизведения от одной бригады к другой.

Наконец, пациенты с так называемой эволюционирующей SMM, т.е. прогрессивным увеличением величины сывороточного M-белка, имели более короткие периоды времени прогрессирования в симптоматические MM, чем пациенты со стабильным M-белком (медиана 1,3 против 3,9 лет).

Табл. 3 показывает основные факторы прогрессирования. Лечение анти-NKClR-антителами может быть следующим:

Таблица 3. Основные факторы прогрессирования

Предикторы прогрессирования SMM	
<b>До консенсусных критериев IMWG</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Уровни M-белка</li> <li>• процент ВМРС</li> <li>• Протеинурия легкой цепи (&gt;50 мг/24 ч)</li> <li>• изотип IgA</li> <li>• MRI-аномалии позвоночника</li> <li>• Показатель мечения плазматических клеток костного мозга (ВМРС)</li> </ul>
<b>Использование консенсусных критериев IMWG</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Уровни M-белка</li> <li>• процент ВМРС</li> <li>• Лишенная аномалии степень легкой цепи</li> <li>• Процент фенотипически аномальных ВМРС</li> <li>• Иммунопарез</li> <li>• Эволюционирующий паттерн</li> </ul>

### Лечение SMM анти-NKCIR-соединениями

Анти-NKCIR-соединения могут вводиться выгодным образом пациентам, имеющим SMM или MGUS, например, как определено стандартными определениями International Myeloma Working Group. В одном варианте осуществления пациент имеет плохой прогностический признак (например, находится в группе, имеющей высокий риск прогрессирования), например этот пациент имеет мутацию, ассоциированную с плохим прогностическим признаком, или находится в группе 1 в соответствии с группированием в табл. 2. Необязательно, пациенты, имеющие один или более факторов риска прогрессирования в MM, например попадающие в группы 1, 2 или 3, могут быть идентифицированы или выбраны на основе вероятности прогрессирования в активную множественную миелому (см., например, критерии Kyle RA et al., N Engl J Med 2007; 356: 2582-90) и лечиться анти-NKCIR-соединением. Пациенты могут лечиться анти-NKCIR-антителами в соответствии с дозами и схемами введения, описанными здесь. Анти-NKCIR-лечение может быть в виде монотерапевтического лечения или в виде лечения в комбинации с другими агентами, используемыми в лечении этого заболевания. Предпочтительно, однако, анти-NKCIR-антитела будут вводиться без сопутствующего применения химиотерапевтических агентов, которые оказывают отрицательное действие на активность NK-клеток.

### Множественная миелома (MM)

Множественная миелома является вторым наиболее частым гематологическим раком (19900 новых случаев в США в 2007 г. и сравнимое количество в Западной Европе). MM происходит из злокачественной пролиферации плазматических клеток, которая продуцирует в большинстве, но не во всех клетках клональный иммуноглобулин, так называемый М-белок. MM характеризуется деструкцией скелета, гипокальциемией, нарушением костного мозга и почечной недостаточностью. Точные согласующиеся критерии используются в международном масштабе для определения MM Kyle and Rajkumar, 2009.

### Современное лечение MM

Исторические способы лечения состоят из цитостатической терапии, так называемой "индукции" высокими дозами кортикостероидов и общепринятых митотических химиотерапевтических средств, включающих в себя алкилирующие агенты, или менее сильную (но менее миелотоксическую) комбинацию адриамицина и винкристина.

После индукции следовали наиболее сильные способы лечения, стадии "интенсификации" (также называемой химиотерапией с высокими дозами), обычно введением высоких доз мелфаланалкилятора (200 мг/м<sup>2</sup>). Их миелотоксичность требует гематологического спасения трансплантацией аутологичных гематопоэтических клеток, которая укорачивает эту апластическую фазу. Гематопоэтические клетки обычно мобилизуются из костного мозга в периферическую кровь GCSF и/или циклофосфамидом, вводимыми в конце фазы индукции. Однако интенсификация является приемлемой, по причине безопасности, только у пациентов <65 лет без большой болезненности.

Такие интенсифицирующие виды лечения позволяют с историческими индукционными видами лечения достигать VGPR и PR не более чем у 10-20% пациентов. Без интенсификации, и, следовательно, у пациентов с возрастом >65 лет, полная реакция (CR) и очень хорошая частичная реакция (VGPR) достигались редко. Пять больших рандомизированных исследований были способны продемонстрировать превосходство интенсифицированных схем приема лекарственных средств, в сравнении с химиотерапиями, в отношении реакции, выживания без прогрессирования и в 3 случаях полного выживания (обзор в Attal et al., 2007).

Два новых класса иммуномодулирующих лекарственных средств, "Имидов", например талидомида и леналидомида, и ингибиторов протеасом, например бортезомиба, возникли в последние годы и используются в основном в качестве части комбинированных терапий с кортикостероидами или цитотоксическими химиотерапиями. Оба класса лекарственных средств объединяют по меньшей мере 2 эффекта: цитостатическое действие и модулирование микроокружения плазматических клеток. Объединение этих новых лекарственных средств со стероидами и общепринятыми химиотерапиями, в том числе химиотерапиями с высокими дозами, позволяют улучшить разительно степень реакции и особенно степень VGPR или CR. Однако молекулярная ремиссия с недектируемым минимальным остаточным заболеванием является, по-видимому, когда она может быть документирована, очень редкой, достигаемой у менее чем 10% пациентов в этих условиях, пациенты, которые достигают CR, имеют неожиданный рецидив после нескольких лет.

Первый рецидив реагирует по меньшей мере в 50% этих случаев на лечение, но второй или последующие рецидивы становятся в конечном счете невосприимчивыми к любому доступному лечению. Таким образом, это заболевание остается неизлечимым, за исключением, в небольшом числе молодых пациентов, которые успешно трансплантированы аллогенными гемопоэтическими клетками. Однако токсичность этой процедуры в сильной степени ограничивает ее показания.

Современные терапии остаются ограниченными случаями симптоматических (имеющих симптомы) пациентов. Выгодность любого лечения на прогрессировании или выживании бессимптомных пациентов еще не была продемонстрирована. Показания этих терапий согласованно определены:

У пациентов с возрастом >65 лет или с большим числом совместных заболеваний, лечение состояло из двойной стартовой терапии: мелфолан+преднизон (MP). Несколько исследований показали, что ком-

бинация МР с любым из 3 новых агентов (талидомида, бортезомиба или леналидомида) превосходит стандартный МР. Другие комбинации включают в себя в настоящее время леналидомид+дексаметазон (Dex) и леналидомид+бортезомиб+Dex, которые могут привести даже к лучшим результатам. У пациентов с возрастом >65 лет и без большого числа совместных заболеваний лечение начинается, как и ранее индукцией, позволяющей уменьшить опухолевую массу перед сбором стволовых клеток, и интенсификацией с добавлением аутологичных гемопоэтических клеток. Консолидация посредством повторения цитостатических химиотерапий, объединяющих Имида и ингибиторы протеаз после аутологичной НСТ, только начала исследоваться. Оценивание реакции заболевания как Международные унифицированные критерии реакции EMWG (International MM Working Group), опубликованные в Leukemia в 2006 г. квалифицированной комиссией ведущих исследователей в данной области, должны теперь использоваться во всех испытаниях.

Реакции могут оцениваться различными способами, включающими в себя молекулярную ремиссию (например, определяемую как <1 опухолевая клетка/10000 клеток BM), обычно включающую в себя детектирование и количественное определение минимального остаточного заболевания пациентов в CR с использованием ПЦР реального времени из проб костного мозга с аллельными специфическими олигонуклеотидами. Используется также мультипараметрическая проточная цитометрия. Другие способы включают в себя определение количества свободных легких цепей, которые могут определяться количественно в сыворотке, и иммунологическое оценивание костного мозга.

Полные и частичные реакции на индукционную (стартовую), консолидационную (объединенную) (в том числе интенсификационную) терапии могут быть оценены в соответствии со стандартными руководствами (например, руководствами IMWG). Пациенты с CR, PR или VGPR могут лечиться анти-NKCI-антителами этого изобретения.

#### **Лечение ММ анти-NKCI-соединениями**

Анти-NKCI-соединения могут вводиться выгодным образом в виде пост-индукционной (и/или консолидационной и/или интенсификационной) терапии после лечения с использованием химиотерапии и/или лечения иммуномодулятором (например, Имида или ингибитора протеосом), в пациентах, которые перенесли частичную или полную реакцию на такую индукционную и/или, необязательно, консолидационную терапию и, следовательно, имеют минимальное заболевание. Пациенты, достигшие реакции или ремиссии после терапии, например после индукционной и, необязательно, консолидационной терапии, могут быть лечиться анти-NKCI-антителами в соответствии с дозами и схемами введения лекарственных средств, описанными здесь. Лечение анти-NKCI-антителами может быть в виде лечения монотерапевтическим агентом или в комбинации с другими агентами, используемыми в лечении этого заболевания. Однако, предпочтительно, анти-NKCI-антитела будут вводиться без сопутствующего применения химиотерапевтических агентов, которые оказывают отрицательное действие на активность NK-клеток.

#### **Схемы введения и доз анти-NKCI-антител**

В одном аспекте это изобретение обеспечивает способы лечения этого изобретения, которые предусматривают введение индивидууму композиции, содержащей анти-NKCI-антитело в терапевтически эффективном количестве. Терапевтически эффективное количество может быть, например, дозой приблизительно 0,0003 мг (антитела)/кг (массы пациента) приблизительно 3 мг/кг (например, приблизительно 0,003 - приблизительно 3 мг/кг, например, приблизительно 0,015 приблизительно 3 мг/кг, например, любой из приблизительно 0,075 мг - приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 0,3 - приблизительно 3 мг/кг и приблизительно 1 - приблизительно 3 мг/кг, или любой из приблизительно 0,0003 мг/кг, приблизительно 0,003 мг/кг, приблизительно 0,015 мг/кг, приблизительно 0,075 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг и приблизительно 3 мг/кг). Дозы и препараты анти-NKCI-антител описаны в РСТ заявке № WO 2008/084106, описание которой включено здесь посредством ссылки. В одном варианте осуществления этот способ предусматривает повторение этого введения по меньшей мере один раз, например, с частотой приема доз в диапазоне 3 раз в день - один раз в 2 месяца. Эта доза может также вводиться, например, по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере 6 раз или по меньшей мере 10 раз. В одном варианте осуществления это антитело вводят внутривенно. В другом варианте осуществления связывание этого антитела с ингибирующим KIR на поверхности NK-клетки потенцирует цитотоксическую активность этой NK-клетки. Еще в одном варианте осуществления, это антитело является перекрестно реактивным анти-NKCI-антителом. Например, это антитело может быть антителом 1-7F9 в препарате, описанном в РСТ заявке № WO 2008/084106.

В одном предпочтительном варианте осуществления эту дозу выбирают для обеспечения, по существу, полного насыщения в пациентах-людях. В данном контексте, термин "по существу, полное насыщение" относится к по меньшей мере 90% заполненности NKCI-мишеней и предпочтительно по меньшей мере 95% заполненности рецептора. Этот способ необязательно включает в себя оценивание пациента на потенцирование NK-клеток и/или противоопухолевую активность (которое может выполняться с применением любого подходящего способа, несколько из которых известны в данной области, включающего в себя, например, уровень заполненности KIR, маркер CD107a и т.д., как описано здесь). Этот препарат вводят обычно i.v. введением на протяжении подходящего периода времени, например прибли-

зительно 1 ч.

Например, анти-NKCIR-антитело может вводиться в дозе и с частотой введения доз, достигающих по меньшей мере приблизительно 90%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% NKCIR-заполненности на NK-клетках в плазме в течение по меньшей мере приблизительно одного, двух, трех или шести месяцев, с получением посредством этого длительного насыщения в течение полонгированного периода времени (например, по меньшей мере 3 месяца, 6 месяцев). В отдельных вариантах осуществления эта доза находится в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 3 мг/кг, от приблизительно 0,3 до приблизительно 3 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 1 мг/кг и от приблизительно 1 до приблизительно 3 мг/кг, дополнительно предпочтительно, когда это антитело является анти-NKCIR-антителом, дополнительно предпочтительно, когда это антитело является 1-7F9. Частота введения доз может находиться в диапазоне один раз в день - один раз в 2 месяца, от приблизительно одного раза в неделю до приблизительно одного раза в 2 месяца; или приблизительно одного раза в месяц. Альтернативно, частота введения доз может быть выбрана из приблизительно трех раз, приблизительно 2 раз и приблизительно одного раза в день; приблизительно пяти раз, приблизительно четырех раз, приблизительно трех раз и приблизительно двух раз в неделю и приблизительно одного раза каждые две, четыре и шесть раз каждые две, четыре или шесть недель.

В одном предпочтительном варианте осуществления дозу анти-NKCIR-антитела, приводящую, по существу, к полному насыщению рецептора (например, по меньшей мере приблизительно 90 или 95% заполненности рецептора) вводят от приблизительно 2 раз в неделю до приблизительно одного раза в месяц, или от приблизительно одного раза в месяц до приблизительно одного раза в 2 месяца. Эта доза может вводиться, например, по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере 6 раз или более. Например, этот способ может предусматривать введение анти-NKCIR-антитела в дозе и при частоте введения доз, достигающих по меньшей мере приблизительно 90 или 95% NKCIR-заполненности на NK-клетках в течение по меньшей мере приблизительно двух недель, одного месяца, 6, 9 или 12 месяцев.

В одном предпочтительном варианте осуществления схема введения лекарственных средств приводит к непрерывному, по существу, полному насыщению рецептора. Вводят дозу анти-NKCIR-антитела, приводящую, по существу, к полному насыщению рецептора в течение периода по меньшей мере приблизительно 1 недели, 2 недель или 1 месяца. Когда эта доза приводит, по существу, к полному насыщению рецептора (например, по меньшей мере приблизительно 90 или 95% заполненности рецептора) в течение приблизительно одной недели, эта доза может вводиться, например, между одним разом в неделю и одним разом каждые две недели; когда эта доза приводит, по существу, к полному насыщению рецептора в течение приблизительно двух недель, эта доза может вводиться, например, между одним разом каждые две недели и одним разом в месяц. Когда эта доза приводит, по существу, к полному насыщению рецептора в течение приблизительно двух недель - приблизительно одного месяца, эта доза может вводиться, например, приблизительно один раз в месяц. В каждой схеме введения лекарственных средств эта доза может вводиться, например, по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере 6 раз или более. Например, этот способ может предусматривать введение анти-NKCIR-антитела в дозе и при частоте введения дозы, достигающих по меньшей мере приблизительно 95% KIR-заполненности на NK-клетках в течение по меньшей мере приблизительно 6, 9 или 12 месяцев.

В другом предпочтительном варианте осуществления схема введения лекарственных средств приводит к прерывистому, по существу, полному насыщению рецептора. Вводят дозу анти-NKCIR-антитела, приводящую, по существу, к полному насыщению рецептора (например, по меньшей мере приблизительно 90 или 95% заполненности рецептора) в течение периода по меньшей мере приблизительно 1 недели, 2 недель или 1 месяца. Когда эта доза приводит, по существу, к полному насыщению рецептора в течение приблизительно одной - двух недель, эта доза может вводиться, например, приблизительно один раз в месяц или один раз в период по меньшей мере двух месяцев (например, один раз каждые два месяца). Когда эта доза приводит, по существу, к полному насыщению рецептора в течение приблизительно двух недель приблизительно одного месяца, эта доза может вводиться, например, приблизительно один раз в период по меньшей мере двух месяцев (например, один раз каждые два месяца). В отдельных вариантах осуществления эта доза находится в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,3 мг/кг, вводимых приблизительно один раз в месяц; в одном варианте осуществления эта доза находится в диапазоне приблизительно 0,1 - приблизительно 3 мг/кг, предпочтительно 1 до приблизительно 3 мг/кг, вводимых приблизительно один раз каждые приблизительно два месяца (или один раз в периоде более двух месяцев, т.е. менее одного раза в периоде двух месяцев), далее предпочтительно, когда это антитело является анти-NKCIR-антителом, далее предпочтительно, когда это антитело является 1-7F9. Это лечение может повторяться, так что эта схема введения лекарственных средств приводит к прерывистому, по существу, полному насыщению рецептора в течение периода по меньшей мере 6, 9 или 12 месяцев.

Это антитело обычно вводят внутривенно, но другие подходящие способы введения известны, а также описаны, например, в WO 2008/084106.

Хотя анти-NKCIR-антитело 1-7F9 или его вариант S241P является предпочтительным антителом для модуляции активности NK-клеток и/или лечения заболевания, другие анти-NKCIR и анти-KIR антитела могут быть также использованы в способах согласно этому изобретению. Такие антитела должны,

однако, иметь сходные величины  $K_D$ , сходный клиренс в пациенте и сходный объем распределения в сравнении с анти-NKCIR-антителом 1-7F9, где "сходный" означает в пределах приблизительно 50%, предпочтительно в пределах приблизительно 30% соответствующего параметра анти-NKCIR-антитела 1-7F9. Анти-KIR-антитело 1-7F9 имеет  $K_D$  высокой аффинности приблизительно 4 нг/мл и  $K_D$  низкой аффинности приблизительно 20 нг/мл для доз до 0,015 мг/кг; клиренс приблизительно 0,5 мл/ч/кг и объем распределения 115 мл/кг (см. WO2008/084106). Примерное анти-NKCIR-антитело, применимое в одном или нескольких способах этого изобретения, может иметь следующие свойства: (а) уменьшает или блокирует передачу сигнала ингибирующего NKCIK на NK-клетках; (б) имеет  $K_D$  высокой аффинности от приблизительно 2 до приблизительно 6 нг/мл; (с) имеет  $K_D$  низкой аффинности от приблизительно 10 до приблизительно 30 нг/мл; (д) имеет клиренс от приблизительно 0,25 до приблизительно 0,75 мл/ч/кг, (е) имеет объем распределения от приблизительно 50 мл/кг до приблизительно 175 мл/кг. Заполненность рецептора анти-NKCIR-антителами может быть определена с использованием анализов, описанных в данном изобретении, адаптированных к конкретному NKCIK, связываемому этим антителом (см., например, пример 2). Фармакокинетические свойства анти-NKCIR-антител могут быть определены в данном изобретении с использованием анализов, описанных в данном изобретении, адаптированных к конкретному анти-NKCIR-антителу. (см., например, пример 1).

### Примеры

#### Пример 1. Фармакинетика в пациентах

Концентрации в плазме анти-NKCIR-антитела 1-7F9 определяют при помощи ELISA, как описано вкратце ниже.

Планшеты покрывают раствором для покрытия KIR2DL3 (100 мкл на лунку) и инкубируют в течение ночи при приблизительно +4°C. Затем эти планшеты промывают 3 раза промывочным буфером с использованием моечного автомата для планшетов (400 мкл на лунку). Добавляют блокирующий буфер (200 мкл на лунку) и планшеты инкубируют в течение приблизительно 2 ч на планшет-шейкере при комнатной температуре. После этого эти планшеты промывают снова 3 раза промывочным буфером (400 мкл на лунку).

Стандарты, контроли качества и пробы добавляют в эти планшеты (100 мкл на лунку) перед инкубированием в течение приблизительно 2 ч на планшет-шейкере при комнатной температуре. Перед добавлением рабочего раствора анти-IgG4:пероксидаза (100 мкл на лунку) эти планшеты промывают еще 3 раза (как описано выше). Затем эти планшеты опять инкубируют в течение приблизительно 2 ч на планшет-шейкере при комнатной температуре, после чего их опять промывают 1 раз.

ТМВ добавляют в эти планшеты (100 мкл на лунку), которые затем инкубируют в течение приблизительно 30 мин на планшет-шейкере при комнатной температуре. Ферментативную реакцию заканчивают добавлением стоп-раствора (50 мкл на лунку). Оптическую плотность регистрируют при 450 нм (ссылочный фильтр 650 нм). Нижний предел количественного определения для этого изобретения равен 5000 нг/мл и верхний предел количественного определения для этого изобретения равен 110,0 нг/мл.

#### Пример 2. Анализ заполненности KIR

Заполненность рецептора оценивают на пробах цельной крови человека анализом четырехцветной флуоресценции. Вкратце, уровни свободного и связанного рецептора KIR2D оценивают на Т- и NK-лимфоцитах в ЭДТА-анти-коагулированной периферической крови. Анализ свободных сайтов будет оценивать несвязанный KIR2D окрашиванием PE-конъюгированного 1-7F9, который связывается с молекулой KIR2D. Анализ связанных сайтов будет оценивать KIR2D-рецепторы, заполненные 1-7F9, окрашиванием PE-конъюгированным мышинным моноклональным антителом против IgG4-человека, которое узнает 1-7F9, связанный с рецепторами KIR2D. Эти Свободный и Связанный Анализы позволят оценить как процентное положительное окрашивание, так и интенсивность флуоресценции [MESF] для 1-7F9-PE или анти-hIgG4-PE. Следующие комбинации конъюгированных антител используют в следующих двух анализах:

Анализ свободных сайтов: CD3/1-7F9/CD45/CD56

Анализ связанных сайтов: CD3/hIgG4/CD45/CD56

Пробы анализируют на Becton Dickinson FACScalibur с использованием программного обеспечения Becton Dickinson Cellquest. Т-клетки определяют как CD45+CD3+ лимфоциты и NK-клетки определяют как CD45+CD3-CD56+ клетки.

#### Пример 3. Клиническое исследование AML

Однодозовое эскалационное исследование (с увеличением дозы) проводили у пожилых пациентов с AML (>60 лет), которые находятся в первой полной ремиссии после индукционной (стартовой) и консолидационной (объединенной) химиотерапии и не могут подвергаться трансплантации костного мозга. Применяли стандартную программу 3+3 и в целом исследовали 7 дозовых уровней: диапазон доз от 0,0003 до 3 мг/кг. После введения доз этих пациентов подвергали мониторингу на безопасность, РК и заполненность KIR, пока заполненность KIR не становилась уже недетектируемой.

Проводили также расширенное исследование. Пациенты с AML, которые завершили исследование с эскалацией дозы, и пациенты, которые все еще находились в полной ремиссии, могли участвовать в расширенном исследовании, в котором эти пациенты получали дозы до 6 раз в месяц. Эти пациенты по-

лучали ту же самую дозу, которую они получали в предыдущем исследовании.

#### **Пациенты, материалы и способы**

В обоих исследованиях пожилые пациенты с AML (в возрасте >60 лет) в их первой полной ремиссии (CR) и не подходящие для трансплантации, не могли быть выбранными для этих исследований. AML была в соответствии с критериями WHO. (Brunning RD, Matutes E, Harris NL et al.: Acute myeloid leukaemia: Introduction. In Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al., Eds.: Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press, 2001. World Health Organization Classification of Tumors, 3, pp 77-80). Ремиссия была морфологической полной ремиссией (CR), определяемой в соответствии с критериями NCI (Cheson et al., J CO, Vol. 21, no. 24, pp 4642-4649 (2003)), или CRi с неполным восстановлением количества тромбоцитов только после 1 или 2 циклов индукционной (стартовой) химиотерапии и по меньшей мере 1 и максимально 6 циклами консолидационной (объединенной) терапии.

При скрининге в исследовании с эскалацией дозы время с последнего приема дозы химиотерапии было по меньшей мере 30 дней и не более чем 120 дней. Другие критерии способности к участию в испытании включали в себя (но не ограничивались ими) экспрессию KIR2DL1 и 2/3 на NK-клетках, ECOG (Oken, M.M., et al., Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 5:649-655, 1982) статус 0-2 и восстановление из всех токсичностей из предыдущего лечения.

Для этого расширенного исследования дополнительным критерием возможности участия в испытании было завершение исследования с эскалацией дозы с приемлемым профилем безопасности.

Дополнительные критерии включали в себя абсолютное количество нейтрофилов  $>1 \times 10^9/\text{Л}$ , тромбоцитов  $>80 \times 10^9/\text{Л}$ , менее 5% бластов в костном мозге, отсутствие палочек Ауер, отсутствие симптомов заболевания, восстановление из острых токсичностей всех предыдущих антилейкозных терапий, KIR-экспрессии на NK-клетках пациента (способность связывать анти-NKCIR-антитело 1-7F9), отсутствие дисфункции основного релевантного органа согласно мнению Исследователя и следующие клинические лабораторные величины: (a) Сывороточный креатинин  $<2$  мг/дл, (b) Общий билирубин  $<1,5 \times$  верхний предел нормальной величины и (c) AST  $<3 \times$  верхний предел нормальной величины.

#### **Программа исследования**

Исследование с увеличением дозы является многоцентровым исследованием открытой категории, безопасности и толерантности с увеличением единственной дозы. Семь уровней дозы планируются для исследования: 0,0003, 0,003, 0,015, 0,075, 0,3, 1 и 3 мг/кг. Для этого исследования выбирают общий дизайн (3+3). Каждый пациент получает одну дозу и подвергается мониторингу на безопасность, фармакокинетику и фармакодинамику, пока не обнаруживается детектируемая KIR-заполненность на NK-клетках пациентов. Безопасность, PK и KIR-заполненность анализируют на текущей основе, и данные, полученные во время первых 4 недель после приема доз из каждой группы доз, обычно образуют основу решения относительно эскалации дозы.

Расширенное исследование планируют как исследование с повторяемым введением доз, открытой категории, безопасности и толерантности. Доза, даваемая индивидуальному пациенту, является такой же, какую пациент получал в исследовании с единственной дозой. Пациент может получать 6 введений с интервалами 4 недели, т.е. 6 циклов предоставления доз с максимальной продолжительностью 6 месяцев. Каждый цикл введения дозы состоит из визита для получения дозы и визита для мониторинга на безопасность, пока не обнаруживается недетектируемая KIR-заполненность на NK-клетках пациента. Продолжительность этого периода наблюдения безопасности зависит от получаемой дозы, и ожидается, что она составляет максимально 24 недели после последнего введения доз.

Безопасность (т.е. наблюдаемая токсичность) в отношении введения анти-NKCIR-антитела 1-7F9 оценивается с использованием критериев из US National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 3.0. Оцениваются также фармакокинетические конечные точки, KIR-заполненность, маркеры активации NK- и T-клеток, опухолевый маркер WT-1, выживаемость без прогрессирования и общая выживаемость.

#### **Результаты исследования AML**

Насыщение рецептора оценивали в исследовании эскалации дозы среди пациентов, каждый из которых получал уровень дозы 0,0003, 0,003, 0,015, 0,075, 0,3, 1 и 3 мг/кг. В целом, доза 0,0003 мг/кг приводила к частичному насыщению KIR (50% заполненности) в течение периода приблизительно 2 ч; доза 0,003 мг/кг приводила к полному насыщению KIR (90% заполненности) в течение периода менее чем 24 ч; доза 0,015 мг/кг приводила к полному насыщению KIR в течение периода менее чем 7 дней; доза 0,075 мг/кг приводила к полному насыщению KIR в течение периода почти 7 дней; доза 0,3 мг/кг приводила к полному насыщению KIR в течение периода менее чем 14 дней; доза 1 мг/кг приводила к полному насыщению KIR в течение периода менее чем 3 недели (между приблизительно 2 неделями и 3 неделями); доза 3 мг/кг приводила к полному насыщению KIR в течение периода более чем 4 недели.

Пациентов, лечившихся при уровнях доз 0,0003, 0,003, 0,015, 0,075, 0,3, 1 и 3 мг/кг, оценивали на выживание без заболевания (DFS) от времени начала лечения. Результаты показаны в табл. 4. Пациенты, получающие уровни доз 1 и 3 мг/кг, испытывали значимо большее DFS, чем пациенты при более низких дозах. Кроме того, имелось даже более сильное предположение зависимости дозы, при расчете рецидива,

от времени инициирования IPH21-терапии, с медианой 11 недель (диапазон 3-112 недель) при более низких дозах в сравнении с 43 неделями (диапазон 36-71 недель) при более высоких дозах. Таким образом, насыщение рецептора, в том числе непрерывное насыщение в течение пролонгированных периодов времени, по-видимому, не индуцирует значимой гипоактивности или недостаточностей в удалении НК-клеток и, по видимому, является более эффективным, чем повторяемая стимуляция дозами, которые не продуцируют насыщения рецептора. Кроме того, DFS для пациентов, получающих 1 и 3 мг/кг (73 недели и далее для пациентов, остающихся свободными от заболевания), является, по-видимому, гораздо более высоким, чем DFS, ожидаемое для пациентов, не получающих лечения. В результате, модулирование НК-клеток анти-NKCR-антителом имеет значимое благоприятное действие при введении пациентам в ремиссии. Это действие является особенно высоким, когда антитело вводят до достижения полного насыщения рецептора по меньшей мере 2 недели и, в частности, с непрерывным полным насыщением рецептора во время прохождения повторяемых циклов введения доз (здесь 6 введений уровней доз 1 и 3 мг/кг, которые приводят к приблизительно одномесячному насыщению при введении один раз в месяц).

Таблица 4

		DFS =Рецидив- CR (недели)	PFS=Рецидив- IPH21 (недели)	Задержка CR IPH2101 (недели)
Все пациенты (21)	Медиана	51	35	20
	Среднее	67	47	21
Группа = 0,3 (15)	Медиана	42	10	19
	Среднее	55	36	20
Группа 1-3 мг (6)	Медиана	92	55	26
	Среднее	97	73	24

Пример 4. Клиническое исследование на тлеющей множественной миеломе

Исследование с двумя ответвлениями, использующее две различных дозы анти-NKCR-антитела 1-7F9, проводят на пациентах, имеющих SMM. Первую группу А лечат с использованием 0,2 мг/кг, что приводит к полному (>90%), но транзиторному насыщению, на протяжении по меньшей мере приблизительно 7 дней после каждой инъекции, а группа В получает 2 мг/кг, что приводит к полному и продолжительному насыщению между двумя последовательными инъекциями. Этим пациентам вводят дозы до 6 раз в месяц и исследуют их на критерии безопасности и эффективности, включающие в себя критерии, показывающие прогрессирование заболевания в направлении ММ.

#### Пациенты, материалы и способы

Пациенты, выбранные для этого исследования, имеют SMM любого уровня риска в соответствии с определением, произведенным из определения International Myeloma Working Group (Br J Haematol 2003; 121: 749): Сывороточный белок М>3 г/дл, AND/OR плазматические клетки костного мозга ≤10% с отсутствием данных о повреждении концевой нейромышечной пластинки (CRAB): (С) отсутствием гиперкальциемии: Са<10,5 мг/дл (R) отсутствием почечной недостаточности: креатинин <2 мг/дл (177 мкмоль) или рассчитанный клиренс креатинина (в соответствии с MDRD) >50 мл/мин (A) отсутствием анемии: Hb >11 г/дл (B) отсутствием литического повреждения костей в стандартном освидетельствовании скелета (могла бы использоваться ЯМР-томография (MRI), если она клинически показана).

Пациенты должны также иметь измеряемое заболевание, определяемое как заболевание с сывороточным М-белком >1 г/дл, и не должны иметь усталости, рецидивирующих инфекций или любого клинического подозрения наличия ММ.

#### Программа исследования

Оценивали две дозы, с пациентами, распределяемыми посредством рандомизации:

В группе А: 0,2 мг/кг, приводящая к полному (>90%), но транзиторному насыщению на протяжении по меньшей мере 7 дней после каждой инъекции.

В группе В: 2 мг/кг, приводящая к полному и продолжительному насыщению между двумя последовательными инъекциями.

В обеих группах анти-KIR-антитело 1-7F9 вводят каждые 4 недели на протяжении 1 ч 6 раз. Та же самая доза будет использоваться во время всего исследования во всех пациентах. Анти-KIR антитело 1-7F9 будет вводиться каждые 4 недели в течение 6 циклов. Пациент, заболевание которого достигает, по меньшей мере, минимальной реакции на лечение исследования после 6 циклов, будет лечиться с дополнительным периодом лечения из 6 циклов. Пациенты будут наблюдаться в исследовании до 12 или 18 месяцев, т.е. 6 месяцев после завершения лечения (или дольше, если насыщение KIR будет все еще >30% при 6 месяцах после завершения лечения).

### Критерии оценивания

Реакции классифицируются в соответствии с унифицированными критериями реакции IMWG (Durie BGM et al.; Leukemia 2006; 20: 1467), модифицированными для включения минимальной реакции, полученной из критериев EBMT (Blade et al.; Br J Haematol 1998; 102: 115. Definition of minimal response is derived from EBMT criteria (Blade et al.; Br J Haematol 1998; 102: 115) и требуют как: (a) уменьшения 25-49% в уровне сывороточного белка, так и (b) уменьшения 50-89% в 24-часовой экскреции белка М в моче, которое все еще превышает 200 мг/24 ч.

Иммунофиксация и исследование костного мозга выполняются во всех пациентах, электрофорез сыворотки и мочи которых становится отрицательным; бессывороточные легкие цепи измеряют при базовой линии (фоне) и у всех пациентов, заболевание которых достигает критериев CR, и иммунофенотипирование костного мозга выполняют у всех пациентов, заболевание которых достигает критериев CR. М-белок определяют с использованием дозиметрии на электрофорезе сыворотки и мочи. В случае отсутствия проб мочи реакция будет оцениваться только на уровне сыворотки.

Дополнительно во время периода исследования будут документироваться DOR (продолжительность реакции), PFS (выживание без прогрессирования) и время до прогрессирования (TPP).

Пример 5. Клиническое исследование на множественной миеломе после реакции на терапию первой очереди

Мультицентровое исследование открытой категории, с рандомизированными двумя независимыми разветвлениями, с программой одностадийной фазы II Gehan проводят для оценивания реакции уровней М-белка в сыворотке на две различные схемы введения доз моноклонального анти-KIR-антитела 1-7F9. Пациенты будут получать 4 инъекции 1-7F9, в дозе либо 0,2, либо 2 мг/кг (в соответствии с их рандомизацией), вводимых на протяжении одночасовой инфузии с четырехнедельными интервалами.

### Пациенты, материалы и способы

Выбранными для этого исследования являются пациенты с ММ, которые первоначально получали системную терапию и получали терапию первой очереди, общепринятые дозы химиотерапии или химиотерапию с высокими дозами и аутологичную трансплантацию гематопозитических клеток с последующим консолидационным лечением или без последующего консолидационного лечения.

Пациенты могут иметь остаточное заболевание или реакции на предыдущую терапию. Остаточным заболеванием является заболевание, имеющее: (a) количественно определяемый сывороточный М-белок  $\leq 3$  г/л, за исключением спайка в зоне бета-глобулина, в случае которого М-белок сыворотки считается количественно определяемым при  $\leq 10$  г/л; или (b) сывороточный М-белок  $\leq 3$  г/л, измеряемые участвующие свободные легкие цепи  $\leq 100$  мг/л и коэффициент аномальных свободных легких цепей ( $< 0,26$  или  $> 1,65$ ).

Для пациентов с реакциями, которые являются частичными (PR и VGPR) и в плато, частичная реакция должна удовлетворять унифицированным критериям IMWG: большее чем 50%, уменьшение от величины сывороточного М-белка перед химиотерапевтическим лечением первой очереди и уменьшение в 24-часовом М-белке мочи на  $\leq 90\%$  или до  $< 200$  мг/24 ч. Очень хорошая частичная реакция определяется в соответствии с унифицированными критериями IMWG с 90%-ным или большим уменьшением в сывороточном М-белке плюс уровнем М-белка мочи  $< 100$  мг/24 ч. Фаза плато для пациентов с сывороточным М-белком  $\leq 3$  г/л: стабильные уровни М-белка в сыворотке во время по меньшей мере 2 месяцев и для пациентов с сывороточным М-белком  $< 3$  г/л: стабильные уровни свободной легкой цепи в сыворотке.

Пациенты дополнительно имеют статус работоспособности 0, 1 или 2 ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group).

### Программа исследования

Одну инфузию антитела 1-7F9 вводят каждые 4 недели в дозе либо 0,2, либо 2 мг/кг, в соответствии с группой рандомизации, внутривенным способом на протяжении 1 ч, в течение 4 циклов. Пациентам, реагирующим при 4 месяцах (уменьшение сывороточного М-белка), будут позволять получение дополнительного периода лечения 4-месячными введениями. Та же самая доза будет использована во время всего исследования во всех пациентах одной ветви исследования.

Ожидается, что первая доза, 0,2 мг/кг, приведет к полному насыщению рецептора в течение не более чем 1 недели.

Вторая доза, 2 мг/кг, является слегка более высокой, чем эта доза, насыщающая рецепторы в течение периода по меньшей мере 1 месяца.

### Критерии оценивания

Эффективность оценивают на основе уровней М-белка, определяемых количественно с использованием дозиметрии в сыворотке и 24-часовом электрофорезе мочи, и уровней свободных легких цепей, определяемых количественно с использованием нефелометрии с анализом Freelite сайта связывания. Конечные точки выживаемости, включающие в себя ТТР (время до прогрессирования), PFS (выживание без прогрессирования), DOR (продолжительность реакции) и OS (общая выживаемость).

### Результаты

Из первых 7 пациентов в каждой ветви исследования, лечившихся 0,2 или 2 мг/кг для четырех доз, одну реакцию на лечение наблюдали в ветви лечения 2 мг/кг (продолжительное насыщение рецептора), как оценено по уменьшению М-белка (М-белка, который уменьшается от 25%, как подтверждалось при 2 последовательных визитах).

Все ссылки, в том числе публикации, заявки на патент и патенты, цитируемые здесь, включены тем самым посредством ссылки в их полном объеме и в той же самой степени, как если бы каждая ссылка была отдельно и особо указана как включенная посредством ссылки и была представлена в ее полном виде (до максимальной степени, разрешаемой законом), независимо от любого отдельно обеспеченного включения конкретных документов, сделанных здесь в другом месте.

Применение терминов "a" и "an" и "the" и сходных символов в контексте описания этого изобретения должны рассматриваться как охватывающие как единственное число, так и множественное число, если здесь нет другого указания или явного противоречия с контекстом.

Если нет других указаний, все точные величины, обеспеченные здесь, являются приближенными величинами (например, все точные примерные величины, обеспеченные в отношении конкретного фактора или измерения, могут рассматриваться как обеспечивающие также соответствующее приближенное измерение, модифицированное посредством "приблизительно, "в случае необходимости).

Описание здесь любого аспекта или варианта осуществления этого изобретения с использованием таких терминов, как "состоящие из", "имеющие", "включающие" или "содержащие", со ссылкой на элемент или элементы, предназначено для обеспечения поддержки для сходного аспекта или варианта этого изобретения, которое "состоит из", "состоит в основном" или "по существу содержит" эти конкретные элемент или элементы, а также описания композиции, состоящей из такого элемента, если нет другого указания или нет явного противоречия с контекстом.

Применение любого или всех примеров или языка примеров (например, "такие как"), обеспеченных здесь, предназначено только для лучшего освещения этого изобретения и не предполагает ограничения объема этого изобретения, если нет другого указания. Ни одно выражение в этом описании не должно рассматриваться как указывающее на любой незаявленный элемент как существенный для применения на практике этого изобретения.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения гематологического предракового или гематологического ракового заболевания, такого как лейкоз, лимфома, миелома или другое лимфоидное раковое заболевание, у индивидуума, которого ранее лечили от гематологического предракового или гематологического ракового заболевания и который имеет генетическую мутацию, которая коррелирует с плохим прогнозом в отношении продолжительности выживания, выбранную из группы, состоящей из генетической мутации в FLT3 и/или NPM1, реаранжировки в гене Иммуноглобулина (Ig) и/или гене Т-клеточного рецептора, аномалий хромосомы 5 или хромосомы 7 и комплексного кариотипа, где указанный способ предусматривает

введение этому индивидууму терапевтически активного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающих аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи, соответствующую остаткам 31-35 SEQ ID NO: 17;

аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи, соответствующую остаткам 50-65 SEQ ID NO: 17;

аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи, соответствующую остаткам 99-112 SEQ ID NO: 17;

аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи, соответствующую остаткам 24-34 SEQ ID NO: 15;

аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи, соответствующую остаткам 50-56 SEQ ID NO: 15; и

аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи, соответствующую остаткам 89-97 SEQ ID NO: 15,

где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор (KIR) 2DL1 и KIR2DL2/3 и имеют способность блокирования или нейтрализации KIR2DL1- и/или KIR2DL2/3-опосредованного ингибирования природных клеток-киллеров (NK) и потенцирования посредством этого опосредованной NK-клетками цитотоксичности,

где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят этому индивидууму во временной точке, когда этот индивидуум находится в состоянии ремиссии, имеет низкое количество аномальных клеток и/или имеет количество аномальных клеток цитологически детектируемого уровня, и

где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 3,0 мг/кг и с частотой дозирования от одного раза в приблизительно 2 недели до одного раза в приблизительно каждые 2 месяца или дольше.

2. Способ по п.1, где индивидуум имеет по меньшей мере одно из следующего:

- (i) общую отягощенность лейкозом ниже приблизительно  $10^9$  клеток и/или менее чем 5% бластных клеток в костном мозге и/или не имеет признаков или симптомов лейкоза;
- (ii) более чем 25%-ное уменьшение в уровне М-белка в сыворотке;
- (iii) более чем 50%-ное уменьшение в уровне М-белка в сыворотке;
- (iv) 10% или более плазматических клеток в костном мозге, но не удовлетворяет критериям для множественной миеломы (ММ);
- (v) уровни М-белка в сыворотке, большие чем 3 г/дл или равные 3 г/дл;
- (vi) 10% или более плазматических клеток в костном мозге без признаков повреждения конечного органа;
- (vii) уровни М-белка в сыворотке, большие чем 3 г/дл или равные 3 г/дл, имеет 10% или более плазматических клеток в костном мозге и необязательно не имеет признаков повреждения конечного органа;
- (viii) менее чем 10% плазматических клеток в костном мозге.

3. Способ по п.1 или 2, где указанные антитело против KIR или его антигенсвязывающий фрагмент:

- (i) представляют собой химерное антитело, антитело человека или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;
- (ii) имеют изотип IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM и/или
- (iii) включают Fc-домен, который содержит по меньшей мере одну мутацию, которая влияет на одну или более эффекторных функций, протеолиз, связывание FcR, гликозилирование и период полувыведения.

4. Способ по п.3, где указанные антитело против KIR или его антигенсвязывающий фрагмент имеют изотип IgG1 или IgG4.

5. Способ по любому из пп.1-4, где указанные антитело против KIR или его антигенсвязывающий фрагмент вводят по меньшей мере в одном из следующих условий:

- (i) в виде фармацевтически приемлемой композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела против KIR или его антигенсвязывающего фрагмента;
- (ii) в количестве, приводящем, по существу, к полному насыщению KIR2DL1 и/или KIR2DL2/3 на NK-клетках в течение периода по меньшей мере приблизительно 1 недели;
- (iii) в количестве, приводящем, по существу, к полному насыщению KIR2DL1 и/или KIR2DL2/3 на NK-клетках в течение периода по меньшей мере приблизительно 2 недель;
- (iv) в количестве, приводящем, по существу, к полному насыщению KIR2DL1 и/или KIR2DL2/3 на NK-клетках в течение периода по меньшей мере приблизительно 1 месяца;
- (v) при частоте дозирования от одного раза в приблизительно каждый 1 месяц до одного раза в приблизительно каждые 2 месяца или дольше;
- (vi) при частоте дозирования от одного раза в приблизительно каждые 2 недели до одного раза в приблизительно каждый 1 месяц;
- (vii) при частоте дозирования приблизительно один раз каждые 2 месяца;
- (viii) в диапазоне доз от приблизительно 0,3 до приблизительно 3,0 мг/кг;
- (ix) в диапазоне доз от приблизительно 0,1 до приблизительно 1,0 мг/кг;
- (x) в диапазоне доз от приблизительно 0,1 до приблизительно 3,0 мг/кг;
- (xi) в дозе приблизительно 0,2 мг/кг и
- (xii) в дозе приблизительно 0,3 мг/кг.

6. Способ по любому из пп.1-5, где индивидуум имеет или имел ранее тлеющую множественную миелому (SMM), моноклональную гаммапатию неустановленной значимости (MGUS), миелодиспластический синдром (MDS), острый миелоидный лейкоз (AML), множественную миелому (ММ), хронический миелогенный лейкоз (СМЛ), хронический гранулоцитарный лейкоз (СGL) или хронический лимфоцитарный лейкоз (СLL).

7. Способ по любому из пп.1-6, где присутствие генетической мутации, которая коррелирует с плохим прогнозом в отношении продолжительности выживания определяют путем получения клеточного образца от индивидуума, идентификации и выделения популяции аномальных клеток в образце, выделения нуклеиновой кислоты из выделенных аномальных клеток и приведения выделенной нуклеиновой кислоты из аномальных клеток в контакт с одной или более нуклеиновыми кислотами, которые нацелены на генетическую реаранжировку, которая коррелирует с плохим прогнозом в отношении продолжительности выживания.

8. Способ по любому из пп.1-7, где гематологическое предраковое или гематологическое раковое заболевание представляет собой AML, а генетическая мутация, которая коррелирует с плохим прогнозом в отношении продолжительности выживания, включает мутацию в FLT3 или NpM1.

9. Способ по любому из пп.1-8, где указанные антитело против KIR или его антигенсвязывающий фрагмент:

- (i) содержат вариабельную область легкой цепи, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15;
- (ii) содержат вариабельную область легкой цепи, имеющую идентичность последовательности по

меньшей мере 95% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15;

(iii) содержат вариабельную область легкой цепи, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 98% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15;

(iv) содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

(v) содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17;

(vi) содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17;

(vii) содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 98% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17;

(viii) содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17;

(ix) содержат вариабельную область легкой цепи, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, и содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17;

(x) содержат вариабельную область легкой цепи, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, и содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17;

(xi) содержат вариабельную область легкой цепи, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 98% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, и содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 98% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17; или

(xii) содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.



Фиг. 1

**A**

1. 50  
 DF-200 Легкая переменная (1) M--ESQTLVFIISILLWLYGNDGKIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASEN  
 PAN2D- Легкая переменная (1) MDFVQIPSPFLISASVIMSRGQIVLTPSPASMSAELGERVMTCTASSS  
 Консенсус (1) Q F I L A G N I V L T Q S P S N S S I G E R V T L T C A S

51 100  
 DF-200 Легкая переменная (49) VVL-YVSWYQKPEQSPKLLTYGASNRVYLGVPDRPTGSGSATDFLFISS  
 PAN2D- Легкая переменная (51) VSSYLWYQKPGSSDKLWYSTSNLASGVPARPSGSGSATYSLFISS  
 Консенсус (51) V S Y L W Y D Q K P S P K L I Y S K S G V P R P S G S G S A T F S L F I S S

101 131  
 DF-200 Легкая переменная (98) VQAKDLADYKCGQGTSPYPTFGGCKLEIKR  
 PAN2D- Легкая переменная (101) XEAEADAATYVCHQYERSPPTFGGCKLEIKR  
 Консенсус (101) M A N D A Y N C Q H P T F G G G I K L E I K R

**B**

DF-200 Легкая переменная (44) KASENVVT-YVS (SEQ ID NO.3)  
 PAN2D- Легкая переменная (46) TASSSVSSVLY (SEQ ID NO.4)  
 Консенсус AS V S Y L

**C**

DF-200 Легкая переменная (70) GASNRVT (SEQ ID NO.5)  
 PAN2D- Легкая переменная (73) STSNLAS (SEQ ID NO.6)  
 Консенсус S N S

**D**

DF-200 Легкая переменная (109) GQGTSPYPT (SEQ ID NO.7)  
 PAN2D- Легкая переменная (112) HQYHRSPT (SEQ ID NO.8)  
 Консенсус Q H P T

Фиг. 2

**DF200 VH**

**A**

MAVLGLLFLCLVTFPSCVLS  
QVQLEQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSFTPYGVHWRQSPGKLEWLGVINSGGNTDY  
NAAFISRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQVNDTAIYYCARNPRPGNYPYGMDYWGQTSVT  
 VSS (SEQ ID NO:9)

**B**

GFSFTPYGVH (SEQ ID NO:10)

**C**

VIWSGGNTDYNAAFIS (SEQ ID NO:11)

**D**

NPRPGNYPYGMDY (SEQ ID NO:12)

Фиг. 3

1-7F9 VL AND VH

A

EIVLTQSPVTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSG  
TDFTLTISLLEPEDFAVYVYCCQQRSNWMTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO:15)

B

gaaattgtgttgacacagtcctcagtcaccctgtcttgtctccaggggaagagccaccctctcctg  
cagggccagtcagagtgtagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggg  
tcctcatctatgatgcattcaacagggccactggcattcccagccaggttcagtgccagtggtctggg  
acagacttcactcaccatcagcagcctagagcctgaagattttcagttattattgtcagcagcg  
tagcaactggatgtacacttttgccaggggaccaagctggagatcaaacgaact (SEQ ID  
NO:16)

C

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSFYAISWVRQAPGQGLEWMGGFIPFGAANYAQKFQGRV  
TITADESTSTAYMELSSLRSDTAVYYCARIPSGSYYYDYMDVWGQGT'TTVTVSS (SEQ ID  
NO:17)

D

caggtccagctggtgacgtctgggctgaggtgaagaagcctgggtcctcctggaaggtcctcctgca  
ggctctggaggcaccctcagtttctatgctatcagctgggtgacagccctggacaagggcttg  
agtggtgggaggttcacccctatcttgggtgacaaactacgcacagaagttccagggcagagtc  
acgattaccgggacgaatccacgagcagcctacatggaactgagcagcctgagatctgacgacac  
ggcctgtattactgtgagcaatccctagtgaggctactactacgactacgatatggagctctggg  
gccaaggaccacggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO:18)

Фиг. 4



Фиг. 5

1 HEGVHRKPSL LAHPGRLVKS EETVILQCWS DVMFEHP[L]LH R[EG]M[AN]D[TL]R  
51 L[IT]GEHHDGVS KAN[P]SISRMT Q[D]LAGTYRC[S] GSVTHS[P]YQV SAPSDPLDIV  
101 IIGLYEKPSL SAQLGPTVLA GENVTLSCSS RSSYDMYHLS REGEAHERRL  
151 PAGPKVNGTF QADFPLGPAT HGGTYRCFGS FHDSPEYWSK SSDPLLVSVT  
201 GNPNSNSWPSP TEPSSKTGNP RHLH

Фиг. 6