(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 036545 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.20

(21) Номер заявки
201391755

(22) Дата подачи заявки
2012.05.25

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) АНТИ-KIR АНТИТЕЛА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) **61/489,806**
(32) **2011.05.25**
(33) **US**
(43) **2014.08.29**
(86) **PCT/IB2012/001512**
(87) **WO 2012/160448 2012.11.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИННЕЙТ ФАРМА, С.А. (FR)

(72) Изобретатель:
Роман Франсуа, Андре Паскаль (FR)

(74) Представитель:
Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Кондакова Е.В., Соболев А.Ю. (RU)

(56) C. SOLA ET AL.: "Genetic and antibody-mediated reprogramming of natural killer cell missing-self recognition in vivo", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 106, no. 31, 4 August 2009 (2009-08-04), pages 12879-12884, XP055053898, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0901653106, page 12882

WO-A2-2007042573

GAËLLE DAVID ET AL.: "Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies", IMMUNOLOGY, vol. 128, no. 2, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 172-184, XP055053865, ISSN: 0019-2805, DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03085.x, the whole document

ERIC VIVIER ET AL.: "Natural Killer Cells: From Basic Research to Treatments", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 2, 1 January 2011 (2011-01-01), XP055053962, DOI: 10.3389/fimmu.2011.00018, the whole document

ERIC VIVIER ET AL.: "Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer", NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY, vol. 12, no. 4, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 239-252, XP055023835, ISSN: 1474-1733, DOI: 10.1038/nri3174, the whole document

NICOLAS SCHLEINITZ ET AL.: "Natural killer cells in human autoimmune diseases", IMMUNOLOGY, vol. 131, no. 4, 1 December 2010 (2010-12-01), pages 451-458, XP055053983, ISSN: 0019-2805, DOI: 10.1111/j.1365-2567.2010.03360.x, the whole document

(57) Изобретение относится к соединениям, которые ингибируют полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, включая соединения (например, анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела), которые нейтрализуют ингибиторные рецепторы NK-клеток, и способам применения таких соединений и их композиций для лечения и профилактики воспалительных или аутоиммунных заболеваний.

036545 B1

036545 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 61/489806, поданной 25 мая 2011 г., описание которой включено в настоящий документ в полном объеме.

Область техники

Данное изобретение относится к модуляции активности NK-клеток с использованием иммуномодулирующих анти-KIR антител для лечения или профилактики воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в частности заболеваний, опосредованных, по меньшей мере, частично, провоспалительными Т-клетками.

Уровень техники

Натуральные киллеры (NK-клетки) являются подгруппой больших гранулярных лимфоцитов, которые работают в качестве цитотоксических иммунных клеток. Цитотоксическая активность NK-клеток в природе направлена против клеток-мишеней (например, раковых клеток, инфицированных вирусами клеток) и, как правило, выражается в результате установления "баланса" между положительными и отрицательными сигналами, передаваемыми соответственно активирующими и ингибирующими рецепторами на поверхности этих клеток.

NK-клетки могут быть идентифицированы любым количеством известных клеточных поверхностных маркеров, которые различаются для различных видов (например, у индивидуума часто используют CD56, CD 16, NKp44, NKp46 и NKp30; у мышей часто используют NK1.1, Ly49A-3, CD49b). В активированном состоянии NK-клетки способны убить определенное количество аутологических, аллогенных и даже ксеногенных опухолевых клеток или инфицированных вирусом клеток, некоторые бактерии (например, возбудителя брюшного тифа Salmonella typhi) и других клеток-мишеней. NK-клетки, по-видимому, предпочтительно убивают Т-клетки-мишени, экспрессирующие на поверхности малое количество или вообще не экспрессирующие главный комплекс гистосовместимости класса I (MHCI или MHC-I). NK-клетки также способны убивать клетки-мишени, с которыми связаны молекулы антител; это механизм, известный как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC). В реакции против клеток-мишеней NK-клетки могут высвобождать комплекс порообразующих белков, называемых перфоринами, протеолитические ферменты-гранзимы, и цитокины/хемокины (например, ФНО, IFNγ), которые непосредственно приводят к апоптозу целевых клеток или их лизису, или другие вещества, которые регулируют иммунный ответ. После активации NK-клетки также могут экспрессировать Fas-лиганд (FasL), что позволяет этим клеткам индуцировать апоптоз в клетках, которые экспрессируют Fas.

Достаточная активность и число NK-клеток обычно являются необходимыми для развития адекватного NK-клеточного иммунного ответа. NK-клетки могут присутствовать в нормальном числе в организме, но если они не активированы, то эти клетки будут неэффективны при выполнении жизненно важных функций иммунной системы, таких как устранение аномальных клеток. Снижение активности NK-клеток связано с развитием и прогрессированием многих заболеваний. Например, исследования показали, что низкая активность NK-клеток вызывает большую склонность пациентов к таким заболеваниям, как синдром хронической усталости (CFS), вирусные инфекции, а также развитие рака.

Активность NK-клеток регулируется рецепторами, модулирующими активность NK-клеток (NK cell activity-modulating receptors, NKCAMR), которые могут быть специфичны к различным лигандам, таким как MHC-I, гомологи MHC-I, или другие биологические молекулы, экспрессирующиеся на клетках-мишенях. NK-клетки индивидуума обычно экспрессируют ряд активирующих и ингибирующих рецепторов. Активность NK-клеток регулируется балансом сигналов, передаваемых с помощью этих активирующих и ингибирующих рецепторов. Большинство рецепторов, модулирующих активность NK-клеток, принадлежат к одному из двух классов белков: надсемейству (IgSF) иммуноглобулин (Ig)-подобных рецепторов или надсемейству лектин-подобных рецепторов С-типа (CTLR). Подробнее Radaev and Sun (2003), Annu. Rev. Biomol. Struct. 32 93-114). Тем не менее, известны другие формы NKCAMR.

Многие активирующие NK-клетки рецепторы принадлежат к надсемейству Ig (IgSF) (такие рецепторы также могут упоминаться как Ig-подобные рецепторы, или "ILR" в данном тексте). Активирующие рецепторы NK ILR (AILR) включают, например, CD2, CD16, CD69, DNAX вспомогательную молекулу-1 (DNAM-1), 2B4, NK1.1; киллерные иммуноглобулин (Ig)-подобные активирующие рецепторы (KAR); ILT/LIR, а также природные рецепторы цитотоксичности (NCR), такие как NKp44, NKp46 и NKp3. Несколько других активирующих рецепторов принадлежат к надсемейству CLTR (например, NKRP-1, CD69; CD94/NKG2C и CD94/NKG2E гетеродимеры, NKG2D гомодимеры и у мышей активирующие изоформы Ly49, например Ly49A-D). Тем не менее другие активирующие рецепторы (например, LFA-1, VLA-4) принадлежат к надсемейству белков-интегринов, а другие активирующие рецепторы могут иметь другие отличающиеся структуры. Многие активирующее рецепторы обладают внеклеточными доменами, которые связываются с молекулами MHC-I, и цитоплазматическими доменами, которые являются относительно короткими и не имеют сигнального иммунорецепторного ингибиторного мотива на основе тирозина (ITIM), характерного для ингибирующих рецепторов NK. Трансмембранные домены этих рецепторов обычно имеют заряженный аминокислотный остаток, который облегчает их связь с ассоциро-

ванными с передачей сигнала молекулами, например CD3zeta, FceRIγ, DAP12 и DAP10 (2B4, однако, видимо, является исключением из этого общего правила), которые содержат короткие аминокислотные последовательности, называемые иммунорецепторными активирующими мотивами на основе тирозина (ITAM), которые распространяют сигналы, активирующие NK-клетки. Рецептор 2B4 содержит четыре имунорцепторных мотива переключения на основе тирозина (ITSM) в его цитоплазматической части. ITSM мотивы можно найти в NKCAR CS1/CRACC и NTB-A. Цитоплазматические домены 2B4 и SLAM содержат два или более уникальных мотива на основе тирозина, которые напоминают мотивы, представленные в активирующих и ингибирующих рецепторах (на основе тирозина) и могут связывать белки, содержащие SH2-домен: SHP-2 и SLAM-ассоциированный белок (SAP).

Стресс-индуцированные молекулы, например, MIC-A, MIC-B и ULBP (у людей) и Rae-1 и H-60 (у мышей), могут служить в качестве лигандов для активирующих рецепторов, таких как гомодимер NKG2D. Клеточные углеводы, антигены патогенов и антитела могут также служить лигандами активирующих рецепторов. Например, NKR-P1 может связываться с углеводными лигандами и вызывать активацию NK-клеток, особенно в отношении опухолевых клеток, которые проявляют аберрантный характер гликозилирования. Вирусные гемагглютинины могут служить в качестве лигандов для природных цитотоксических рецепторов (NCR), такие как ILR NKCAR NKp30, NKp44, NKp46 и NKp80.

Активирующие рецепторы могут непосредственно индуцировать активирующие сигналы или могут работать вместе с адаптерными молекулами или другими рецепторами либо в координированной реакции между рецепторами, которые иногда особенно эффективны, либо в парах ко-рецептор - рецептор. Например, у NCR обычно отсутствует ITAM, и рецептор соответственно связывается с адаптерными молекулами через заряженный остаток в трансмембранном домене (например, NKp30 ассоциирует с дзета-цепью CD3; NKp44 ассоциирует с DAP 12 и/или KARAP; NKp46 ассоциирует с дзета-цепью CD3 и FcRIγ цепью), которые, в свою очередь, имеют необязательность связывать протеинтирозинкиназы (PTK), чтобы распространять сигналы, активирующие NK-клетки. CD16, который является значимым для активации NK-клеточной ADCC и продукции цитокинов, ассоциирован с гомодимерами или гетеродимерами, сформированными из CD3 дзета- и/или гамма-цепей. NKG2D, по-видимому, играет дополнительную и/или синергетическую роль с NCR и активирующими рецепторами для NK-клеточной активации. Активация NK-клеток в отношении конкретных мишеней может требовать скоординированной активации, или нескольких активирующих рецепторов, или NCR, или действия только одного рецептора. Другие пусковые поверхностные молекулы, включая и NKp80 и 2B4, по-видимому, действуют как ко-рецепторы для активации NK-клеток.

Активирующие изоформы киллерных иммуноглобулин-подобных рецепторов индивидуума (KIR) (например, KIR2DS и KIR3DS) и мышиный белок Ly-49 (например, Ly-49D и Ly-49H) экспрессируются на некоторых NK-клетках. Активация или толерантность натуральных киллеров (NK-клеток) достигается за счет взаимодействия сигналов, полученных клеткой от активирующих и ингибирующих рецепторов. Киллерные иммуноглобулин-подобные рецепторы (KIR) представляют собой семейство высокополиморфных активирующих и ингибирующих рецепторов, которые служат ключевыми регуляторами функции NK-клеток индивидуума. Отдельные структурные домены у различных членов семейства KIR определяют их функцию, предоставляя места для связывания лигандов или сигнальных белков. Campbell & Purdy (2011), Immunology, 132(3):315-25. Эти молекулы отличаются от их ингибирующих аналогов, которые обсуждаются ниже, отсутствием ITIM в их сравнительно коротких цитоплазматических доменах и наличием заряженной трансмембранной области, которая связывается с передающими сигнал полипептидами, такими как связанные дисульфидными мостиками димеры DAP12.

ILR (IgSF) NK-клеточные ингибиторные рецепторы включают некоторое количество различных человеческих KIR, специфичных к аллотипам HLA-A, -B или -C. KIR могут распознавать множественные аллели в пределах конкретного аллотипа, так, KIR2LD1 распознает HLA-Cw2, Cw4 и Cw6 аллотипы. Надсемейство ингибиторных рецепторов CTLR включает членов семейства CD49/NKG2, которое включает рецепторы, сформированные из лектин-подобных CD49 с различными членами семейства NKG2, такими как NKG2A, распознающих неклассические молекулы MHC-I HLA-E и Qa-1 (у людей и мышей соответственно), и мышиные молекулы L49, которые распознают классический MHC-I у мышей. Напротив, NKRP1A, Nkrp1f и Nkrp1d являются ингибиторными рецепторами, лиганды которых не родственны MHC, но являются членами семейства CTRL, экспрессирующимися на поверхности клеток многих типов, таких как дендритные клетки, макрофаги и лимфоциты.

NKCIR, специфичные к MHC класса I, включают CTLR Ly-49 рецепторы (у мышей); иммуноглобулин-подобные рецепторы лейкоцитов семейства рецепторов IgSF (LIRs) (у людей), KIR (например, p58 и p70 иммуноглобулин-подобные рецепторы киллерных клеток) (у индивидуума) и CTLR CD94/NKG2 рецепторы (у мышей и людей). Все MHC-I-специфические NKCIR обычно используют общий ингибирующий механизм, очевидно, с участием фосфорилирования ITIM в цитоплазматических доменах в ходе связывания MHC-I и привлечения набора тирозин-фосфатаз (например, SHP-1 и SHP- 2) к фосфорилированным ITIM, что приводит к ингибированию проксимальный протеинтирозинкиназы (PTK), участвующей в активации NK через NKCAR. Антитела против модулирующих активацию рецепторов, таких как

KIR, были описаны ранее. Также в предшествующем уровне техники были сделаны, по меньшей мере, некоторые предложения о сочетании антител против NK рецепторов, таких как анти-KIR антитела, с другими противораковыми агентами. Например, WO 2004/056392 описывает анти-NKp30 и/или анти-NKp46 антитела, используемые в смеси с интерлейкином-2 (IL-2). WO 2008/084106 описывает анти-KIR композиции, дозы и режимы дозирования. WO 2005/079766 также описывает комбинации антител (например, антитела к тканеспецифичным факторам), включая анти-KIR антитела, для использования в лечении рака. В WO 2005/003168 и WO 2005/003172 описывают комбинации нескольких анти-KIR антител с различными агентами, в том числе интерлейкином-2 и интерлейкином-21 (IL-21). WO 2005/037306 аналогично описывает комбинации производных IL-21, IL-21 и аналогов IL-21 в сочетании с анти-KIR антителами. WO 2005/009465 описывает комбинацию терапевтических антител (например, Ритуксана (Rituxan)) в сочетании с соединением, которое блокирует ингибирующие рецепторы или стимулирует активирующие рецепторы NK-клеток (например, анти-KIR-моноклональные антитела, например моноклональные антитела DF200, или анти-NKp30 моноклональные антитела), в целях повышения эффективности лечения пациентов терапевтическими антителами.

Аутоиммунные заболевания.

Аутоиммунным заболеванием называется состояние, которое возникает, когда иммунная система ошибочно атакует и разрушает здоровые ткани организма. Есть более чем 80 различных типов аутоиммунных расстройств. Обычно белые клетки крови иммунной системы (лейкоциты) помогают защитить организм от вредных агентов, называемых антигенами. Примерами антигенов являются бактерии, вирусы, токсины, раковые клетки, кровь или ткани другого индивидуума или представителей других видов. Иммунная система производит антитела, которые уничтожают эти вредные агенты.

Тем не менее у пациентов с аутоиммунным расстройствами иммунная система не может различить свое и чужое (например, здоровые ткани и чужеродные антигены). Результатом является иммунный ответ, который разрушает нормальные ткани тела. Эта реакция представляет собой реакцию гиперчувствительности, подобную аллергической реакции. При аллергии иммунная система реагирует на вещества извне, которые она в норме игнорирует. При аутоиммунных заболеваниях иммунная система реагирует на нормальные ткани тела, которые она в норме игнорирует.

Что именно приводит к тому, что иммунная система больше не может отличить здоровые ткани тела от антигенов, неизвестно. Одна теория говорит, что некоторые микроорганизмы (например, бактерии или вирусы) или лекарственные средства могут вызвать некоторые из этих изменений, особенно у людей, которые имеют гены, которые делают их более чувствительными к аутоиммунным заболеваниям.

Аутоиммунное заболевание может привести к разрушению одного или нескольких типов тканей тела, аномальному росту органа, а также к изменению его функции. Аутоиммунное заболевание может повлиять на один или несколько органов или типов тканей. Органы и ткани, чаще всего страдающие от аутоиммунных расстройств, включают кровеносные сосуды, соединительную ткань, железы внутренней секреции (например, щитовидная железа или поджелудочная железа), суставы, мышцы, красные кровяные клетки и кожу. Индивидуум может иметь более одного аутоиммунного расстройства одновременно.

Симптомы аутоиммунного заболевания различаются в зависимости от типа заболевания и локализации аномального иммунного ответа. Общие симптомы, которые часто сопутствуют аутоиммунным заболеваниям, включают усталость, лихорадку и общую слабость (недомогание). Анализы, которые можно сделать, чтобы диагностировать аутоиммунные расстройства, могут включать в себя анализы на антинуклеарные антитела, анализы на аутоантитела, CBC, С-реактивный белок (СРБ) и скорость оседания эритроцитов (ESR).

Лекарственные композиции часто назначают для контроля или уменьшения реакции иммунной системы. Их часто называют иммуносупрессивными лекарственными средствами. Такие лекарственные средства могут представлять собой кортикостероиды (например, преднизон) и нестероидные лекарственные средства, такие как азатиоприн, циклофосфамид, микофенолят, сиролимус или такролимус.

Осложнения возникают часто и зависят от типа заболевания. Побочные эффекты препаратов, используемых для подавления иммунной системы, могут быть очень серьезными, такими как инфекции, которые может быть трудно контролировать. "Autoimmune disorders." MedlinePlus U.S. National Library of Medicine (April 19, 2012).

Воспалительные состояния.

Воспаление является частью комплекса биологического ответа сосудистых тканей на вредоносные объекты, такие как патогены, поврежденные клетки или раздражители. Воспаление является защитной реакцией организма и попыткой удалить вредоносные объекты и начать процесс восстановления. Раны и инфекции никогда не заживают без воспаления. Аналогичным образом прогрессирующее разрушение тканей может поставить под угрозу жизнь организма. Тем не менее хроническое воспаление может также привести к целому ряду заболеваний, таких как сенная лихорадка, периодонтит, атеросклероз, ревматоидный артрит и даже рак (например, рак желчного пузыря). Именно по этой причине воспаления, как правило, строго регулируются организмом.

Воспаление может быть классифицировано как острое или хроническое. Острое воспаление является начальной реакцией организма на вредные воздействия и достигается за счет увеличения движения

плазмы и лейкоцитов (особенно гранулоцитов) из крови в поврежденные ткани. Каскад биохимических событий распространяется и реализуется в воспалительной реакции с участием локальной сосудистой системы, иммунной системы, а также различных клеток в поврежденной ткани. Длительное воспаление, известное как хроническое воспаление, приводит к постепенному изменению типов клеток, присутствующих в участке воспаления, и характеризуется одновременным разрушением и заживлением тканей, вовлеченных в воспалительный процесс. Kindt, et al. (2006), Kuby Immunology [6th Ed.].

Т-клетки участвуют в проявлении воспаления. Дифференцировка наивных Т-клеток приводит к генерации Т-клеточных подгрупп, каждая из которых обладает различным набором экспрессии цитокинов для реализации различных иммунных функций. Через активацию отдельных сигнальных путей этот процесс приводит к дифференцировке Т-хелперов (Th), называемых Th1, Th2 и Th17, и индуцированных регуляторных Т-клеток, которые подавляют Th клетки. Эти отличающиеся друг от друга клетки являются важными элементами для борьбы с инфекционными заболеваниями и раком, однако при нарушениях их функционирования они могут быть ответственны за хронические воспалительные заболевания. Одним из таких заболеваний является воспалительное заболевание кишечника (IBD), где каждая подгруппа Т-клеток может играть определенную роль в развитии болезни. Zenewicz, et al. (2009), Trends in Molecular Medicine, 15(5):199-207.

В то время как NK-клетки получили большую известность в научной литературе относительно их потенциального вклада в противоопухолевый и антивирусный ответы, мало исследований было направлено на изучение роли NK-клеток, в частности подгрупп клеток, экспрессирующих KIR2DL1, 2 и/или 3, в воспалении и аутоиммунных реакциях. Во всяком случае взгляд на эти NK-клетки состоял в том, чтобы стремиться уничтожить NK-клетки или ингибировать NK-клетки на том основании, что они могут способствовать воспалению и аутоиммунным заболеваниям. Эффекты KIR2DL1, 2 и/или 3-опосредованного потенцирования NK-клеточной цитотоксичности при воспалительных процессах до настоящего времени не были рассмотрены.

Следовательно, в данной области техники существует необходимость поиска способов использования модуляции NK-клеток, чтобы обеспечить улучшение состояния пациентов.

Сущность изобретения

В моделях in vivo (трансгенных мышах по KIR2DL3 и их лигандам HLA), разработанных специально для изучения блокирования человеческих KIR2DL1, 2 и 3, было показано, что введение анти-KIR2DL1, 2 или 3 антител способно индуцировать NK-клетки и эффективно уменьшить или устранить индуцированные конканавалином A (Con A) бласты. Con A главным образом действует на Т-лимфоциты и приводит к росту и делению лимфоцитов и поэтому часто используется как модель воспаления. Результаты демонстрируют, что вместо уменьшения или устранения KIR2DL1, 2 и/или 3-положительных NK-клеток в воспалении и аутоиммунных реакциях может быть выгодно усиление их активности, поскольку они могут способствовать удалению прововоспалительных Т-клеток, включая, но не ограничиваясь, Т-клетки в кровотоке, не вызывая связанную с аутореактивностью токсичность.

Настоящее изобретение относится к способам лечения индивидуума, имеющего воспалительное или аутоиммунное заболевание. Способы могут включать введение индивидууму эффективного количество вещества, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. Индивидуум может быть болен воспалительным или аутоиммунным заболеванием, опосредованным Т-клетками, например заболеванием с участием провоспалительных, активированных и/или пролиферирующих Т-клеток (например, в кровотоке или в больной или воспаленной ткани), $CD4^+$ Т-клетками, проникающими в ткани Т-клетками и/или Т-клетками, экспрессирующими HLA-cw3 и/или HLA-cw4. В одном из вариантов индивидуум может иметь воспалительное или аутоиммунное заболевание, выбранное из группы, включающей системную красную волчанку, гранулематоз Вегенера, аутоиммунный гепатит, болезнь Крона, склеродермию, язвенный колит, синдром Шегрена, сахарный диабет типа 1, увеит, миокардит, ревматическую лихорадку, болезнь Бехтерева, ревматоидный артрит, рассеянный склероз и псориаз.

В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела могут быть охарактеризованы на основе их способности блокировать или нейтрализовать KIR2DL1, 2 и/или 3-опосредованное ингибирование NK-клеток и тем самым усиливать активность NK-клеток против недоступных в другом случае клеток-мишеней.

В одном воплощении изобретения антитело может быть одним анти-KIR антителом или комбинацией анти-KJR антител. В другом воплощении антитело может быть комбинацией анти-KIR2DLl антитела и анти-KIR2DL2 антитела, или анти-KIR2DL1 антитела и анти-KIR2DL3 антитела, или анти-KIR2DLl антитела и анти-KIR2DL2 антитела и анти-KIR2DL3 антитела, или анти-KIR антитела, которое связывает по меньшей мере два различных продукта генов человеческих ингибирующих рецепторов KIR, выбранных из группы, состоящей из KIR2DL1, 2 и/или 3, или анти-KIR антител, связывающих каждый из KIR2DL1, 2 и 3, где указанное антитело может быть способно нейтрализовать KIR-обусловленное ингибирование цитотоксичности NK-клеток в NK-клетках, экспрессирующих конкретные KIR2DL1, 2 и/или 3-рецепторы.

В одном воплощении данного изобретения эффективное количество одного или более KIR2DL1, 2 и/или 3-антител может быть количеством таких антител, которое приводит практически к полному на-

сыщению (90% или необязательно 95% связывания рецепторов) KIR2DL1, 2 и/или 3 на NK-клетках в течение по меньшей мере около 1 недели, необязательно около 2 недель, необязательно около 3 недель, необязательно около одного месяца после введения антитела.

В одном воплощении данного изобретения антитела можно дозировать по количеству и частоте введения, что приводит практически к полному насыщению (90%,или необязательно 95% связывания рецепторов) KIR2DL1, 2 и/или 3 на NK-клетках в течение по меньшей мере около 1 недели без значительного "уменьшения насыщения" в течение всего периода лечения. В одном воплощении эффективное количество одного или более KIR2DL1, 2 и/или 3-антител может быть количеством этих антител, которое приводит практически к полному насыщению KIR2DL1, 2 и/или 3 (90% связывания KIR2DL1, 2 и/или 3, необязательно 95% связывания KIR2DL1, 2 и/или 3) на циркулирующих NK-клетках в течение периода по меньшей мере около 2 недель, необязательно около 3 недель, необязательно около одного месяца после введения антитела, и антитела можно дозировать по меньшей мере дважды, когда дозирование происходит примерно раз в две недели, один раз каждые три недели или раз в месяц (последующие дозы отделены друг от друга по времени примерно 2 неделями, 3 неделями или месяцем).

В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела можно дозировать по количеству и частоте введения, что приводит практически к полному насыщению (90%, необязательно 95% связывание с рецепторами) KIR2DL1, 2 и/3 или на NK-клетках в течение по меньшей мере около 1 недели с "уменьшением насыщения" в течение периода лечения. В одном воплощении эффективное количество одного или более KIR2DL1, 2 и/или 3-антител может быть количеством таких антител, которое приводит практически к полному насыщению KIR2DL1, 2 и/или 3 (90% связывание KIR2DL1, 2 и/или 3, необязательно 95% связывание KIR2DL1, 2 и/или 3) на циркулирующих NK-клетках в течение периода по меньшей мере около 2 недель, необязательно около 3 недель, необязательно около одного месяца после введения антитела, и антитела можно дозировать по меньшей мере дважды, когда дозирование происходит примерно раз в два месяца (последующие дозы разделяют по времени около двух месяцев).

В одном воплощении способ получения антител может включать (а) иммунизацию не человеческого млекопитающего иммуногеном, содержащим полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, (б) отбор антител от указанного иммунизированного млекопитающего, у которого указанные антитела связывают указанный полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, и (в) отбор антител (б) которые потенцируют устранение NK-клетками Т-клеток, в частности активированных $CD4^+$ Т-клеток. В другом случае антитела, выбранные на стадии (в), могут быть определены как пригодные для лечения воспалительных или аутоиммунных расстройств. В еще одном воплощении способ получения антител может включать получение библиотеки антител, необязательно способами фагового дисплея. В одном воплощении способ получения антител может включать (а) получение библиотеки антител путем фагового дисплея, (б) отбор антител из указанной библиотеки, где указанные антитела связывают указанный полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, и (в) отбор антител (б) которые потенцируют устранение NK-клетками Т-клеток, в частности активированных $CD4^+$ Т-клеток. Предпочтительно, чтобы антитела, выбранные на стадии (в), были пригодны для лечения воспалительных или аутоиммунных расстройств.

В одном воплощении способ уменьшения или устранения Т-клеток in vitro или in vivo может включать контакт Т-клеток с соединением, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, в присутствии клеток (например, NK-клеток), которые экспрессируют полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом случае Т-клетки могут быть активированными, провоспалительными и/или пролиферирующими Т-клетками, $CD4^+$ Т-клетками, проникающими в ткани Т-клетками и/или Т-клетками, экспрессирующими HLA-cw3 и/или HLA-cw4.

В одном воплощении способ уменьшения или устранения Т-клеток in vivo может включать введение индивидууму с воспалительным или аутоиммунным заболеванием, предпочтительно заболеванием, опосредованным, по меньшей мере, частично, указанными Т-клетками, эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом случае Т-клетки могут быть активированными и/или пролиферирующими Т-клетками, $CD4^+$ Т-клетками, провоспалительными Т-клетками (например, в кровотоке или в больной, или воспаленной ткани), Т-клетками, экспрессирующими HLA-cw3 и/или HLA-cw4, или проникающими в ткани Т-клетками. В еще одном воплощении проникающие в ткани Т-клетки могут проникнуть в больную ткань, включая синовиальные ткани сустава или синовиальные жидкости, в центральную нервную систему, толстую кишку или кожную ткань, но не ограничиваясь этим. В одном воплощении способ уменьшения или устранения Т-клеток включает введение индивидууму с воспалительным или аутоиммунным заболеванием эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом случае указанные Т-клетки представляют собой активированные Т-клетки и/или пролиферирующие Т-клетки, $CD4^+$ Т-клетки, провоспалительные Т-клетки (например, в кровотоке или в больной или воспаленной ткани), проникающие Т-клетки (проникновение в больные ткани, например синовиальные ткани суставов или синовиальную жидкость, в центральную нервную систему, толстую кишку, кожную ткань) и/или Т-клетки, экспрессирующие HLA-cw3 и/или HLA-cw4. В другом воплощении индивидуум может иметь заболевание, опосредованное, по меньшей мере, частично, указанными выше Т-клетками. В еще одном воплощении эффективное количество может быть количеством соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1 2

и/или 3, эффективным для снижения количества указанных Т-клеток.

В одном воплощении изобретения способ для активированных и/или пролиферирующих Т-клеток может включать в себя введение индивидууму с воспалительным или аутоиммунным заболеванием, предпочтительно заболеванием, опосредованным, по меньшей мере, частично, указанными Т-клетками, эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении способ уменьшения количества или устранения Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток включает введение индивидууму с воспалительным или аутоиммунным заболеванием, предпочтительно опосредованным, по меньшей мере частично, указанными видами Т-клеток, эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении изобретения способ для провоспалительных Т-клеток (например, в кровотоке или в больной, или воспаленной ткани) может включать в себя введение индивидууму с воспалительным или аутоиммунным заболеванием, предпочтительно заболеванием, опосредованным, по меньшей мере частично, указанными Т-клетками, эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении изобретения уменьшение или устранение проникающих в ткани Т-клеток (проникновение в больные ткани, например, синовиальные ткани сустава или синовиальную жидкость, в центральную нервную систему, толстую кишку, кожную ткань) может включать в себя введение индивидууму с воспалительным или аутоиммунным заболеванием, предпочтительно заболеванием, опосредованным, по меньшей мере, частично, указанной группой Т-клеток, эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В еще одном воплощении упомянутое соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, представляет собой антитело, фрагмент антитела, пептид, гликоалкалоид, антисмысловые нуклеиновые кислоты, рибозим, ретиноид, аверим, низкомолекулярное соединение или любую их комбинацию. В еще одном воплощении упомянутое соединение представляет собой химерное, гуманизированное, антиидиотипическое, одноцепочечное, бифункциональное или ко-специфическое антитело, или фрагмент такого антитела.

В одном воплощении изобретения способ уменьшения или устранения Т-клеток, экспрессирующих HLA-cw3 и/или HLA-cw4, может включать в себя введение индивидууму с воспалительным или аутоиммунным заболеванием, предпочтительно заболеванием, опосредованным, по меньшей мере частично, указанными Т-клетками, эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В еще одном воплощении указанное соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, представляет собой антитело, фрагмент антитела, пептид, гликоалкалоид, антисмысловые нуклеиновые кислоты, рибозим, ретиноид, аверим, низкомолекулярное соединение или любую их комбинацию. В еще одном воплощении упомянутое соединение представляет собой химерное, гуманизированное, антиидиотипическое, одноцепочечное, бифункциональное или ко-специфическое антитело, или фрагмент такого антитела.

В одном воплощении изобретения упомянутое соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, представляет собой антитело, фрагмент антитела, пептид, гликоалкалоид, антисмысловые нуклеиновые кислоты, рибозим, ретиноид, аверим, низкомолекулярное соединение или любую их комбинацию. В еще одном воплощении упомянутое соединение представляет собой химерное, гуманизированное, антиидиотипическое, одноцепочечное, бифункциональное или ко-специфическое антитело, или фрагмент такого антитела.

В одном воплощении изобретения способ лечения воспалительного заболевания может включать (а) определение наличия у индивидуума воспалительного или аутоиммунного заболевания и, (б) если лицо имеет воспалительное или аутоиммунное заболевание, лечение индивидуума эффективным количеством соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении лечение аутоиммунных заболеваний может включать (а) определение наличия у индивидуума воспалительного или аутоиммунного заболевания и, (б) если лицо имеет воспалительное или аутоиммунное заболевание, лечение индивидуума эффективным количеством соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В еще одном воплощении изобретения упомянутое соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, представляет собой антитело, фрагмент антитела, пептид, гликоалкалоид, антисмысловые нуклеиновые кислоты, рибозим, ретиноид, аверим, низкомолекулярное соединение или любую их комбинацию. В еще одном воплощении упомянутое соединение представляет собой химерное, гуманизированное, антиидиотипическое, одноцепочечное, бифункциональное или ко-специфическое антитело или фрагмент такого антитела.

В одном воплощении способ лечения воспалительного заболевания может включать (а) определение наличия у индивидуума воспалительного заболевания, опосредованного, по меньшей мере, частично, Т-клетками, например провоспалительными, активированными и/или пролиферирующими Т-клетками (например, в кровотоке или в больной или воспаленной ткани), $CD4^+$ Т-клетками, проникающими в ткань Т-клетками, и/или Т-клетками, экспрессирующими HLA-cw3 и/или HLA-cw4, и, (б) если лицо имеет воспалительное заболевание, опосредованное, по меньшей мере частично, указанными Т-клетками, и лечение индивидуума эффективным количеством соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В еще одном воплощении упомянутое соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, представляет собой антитело, фрагмент антитела, пептид, гликоалкалоид, антисмы-

словые нуклеиновые кислоты, рибозим, ретиноид, аверим, низкомолекулярное соединение или любую их комбинацию. В еще одном воплощении упомянутое соединение представляет собой химерное, гуманизированное, антиидиотипическое, одноцепочечное, бифункциональное или ко-специфическое антитело или фрагмент такого антитела.

В одном воплощении изобретения способ лечения аутоиммунных заболеваний может включать (а) определение наличия у индивидуума аутоиммунного заболевания, опосредованного, по меньшей мере, частично, Т-клетками, например провоспалительными, активированными и/или пролиферирующими Т-клетками (например, в кровотоке или в больной или воспаленной ткани), $CD4^+$ Т-клетками, проникающими в ткани Т-клетками, и/или Т-клетками, экспрессирующими HLA-cw3 и/или HLA-cw4, и, (б) если индивидуум имеет аутоиммунное заболевание, опосредованное, при мере частично указанными Т-клетками, и лечение индивидуума эффективным количеством соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В еще одном воплощении упомянутое соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, представляет собой антитело, фрагмент антитела, пептид, гликоалкалоид, антисмысловые нуклеиновые кислоты, рибозим, ретиноид, аверим, низкомолекулярное соединение или любую их комбинацию. В еще одном воплощении упомянутое соединение представляет собой химерное, гуманизированное, антиидиотипическое, одноцепочечное, бифункциональное или ко-специфическое антитело или фрагмент такого антитела.

В одном воплощении изобретения способ лечения воспалительного заболевания у индивидуума может включать (а) оценку наличия, стадии и/или степени развития воспалительного заболевания у индивидуума и (б) введение указанному индивидууму эффективной дозы соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. Необязательно оценка наличия, стадии и/или степени развития заболевания у индивидуума включает анализ уровней аутоантител, СРБ или любого протеолитического фермента, медиатора воспаления или маркера текущего воспаления. Если указанный индивидуум определяется как подходящий для лечения соединением, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3 (например, индивидуум имеет артрит фазе обострения), то проводят введение указанному субъекту эффективной дозы соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В еще одном воплощении данного изобретения упомянутое соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, представляет собой антитело, фрагмент антитела, пептид, гликоалкалоид, антисмысловые нуклеиновые кислоты, рибозим, ретиноид, аверим, низкомолекулярное соединение или любую их комбинацию. В еще одном воплощении упомянутое соединение представляет собой химерное, гуманизированное, антиидиотипическое, одноцепочечное, бифункциональное или ко-специфическое антитело или фрагмент такого антитела.

В одном воплощении данного изобретения способ лечения аутоиммунного заболевания у индивидуума может включать (а) оценку наличия заболевания, стадии и/или развития у индивидуума аутоиммунного заболевания и (б) введение указанному индивидууму эффективной дозы соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. Необязательно оценка наличия, стадии и/или развития заболевания у индивидуума может включать анализ уровней аутоантител, СРБ или любого протеолитического фермента, медиатора воспаления или маркера текущего воспаления. Если указанный индивидуум будет определен как подходящий для лечения соединением, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3 (например, индивидуум болен артритом в стадии обострения), то проводят введение указанному субъекту эффективной дозы соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В еще одном воплощении указанное соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, представляет собой антитело, фрагмент антитела, пептид, гликоалкалоид, антисмысловые нуклеиновые кислоты, рибозим, ретиноид, аверим, низкомолекулярное соединение или любую их комбинацию. В еще одном воплощении упомянутое соединение представляет собой химерное, гуманизированное, антиидиотипическое, одноцепочечное, бифункциональное или ко-специфическое антитело, или фрагмент такого антитела.

В одном воплощении способ лечения воспалительного заболевания у индивидуума может включать (а) определение наличия у индивидуума развившегося воспалительного заболевания и, (б) если указанный индивидуум имеет развившееся воспалительное заболевание, введение упомянутому индивидууму эффективной дозы соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении изобретения способ лечения аутоиммунного заболевания у индивидуума может включать (а) определение наличия у индивидуума развившегося аутоиммунного заболевания и, (б) если указанный индивидуум имеет развившееся аутоиммунное заболевание, введение указанному индивидууму эффективной дозы соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном из вариантов воплощения изобретения указанным соединением являются анти-KIR2DL1, 2 и/или 3-антитела.

В одном воплощении изобретения способ лечения воспалительного заболевания у индивидуума может включать (а) определение у индивидуума приступа, кризиса, обострения или вспышки воспалительного заболевания, а также, (б) если указанный индивидуум имеет приступ, кризис, обострение или вспышку воспалительного заболевания, введение указанному индивидууму эффективной дозы соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении изобретения указанное соединение представляет собой анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела. В одном воплощении способ лечения

аутоиммунного заболевания у индивидуума может включать (а) определение наличия у индивидуума приступа, кризиса, обострения или вспышки аутоиммунного заболевания, а также, (б) если указанный индивидуум имеет приступ, кризис, обострение или вспышку аутоиммунного заболевания, введение указанному индивидууму эффективной дозы соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении указанное соединение представляет собой анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела.

В одном воплощении изобретения способ лечения воспалительного заболевания у индивидуума может включать (а) определение наличия у указанного индивидуума воспалительного заболевания, характеризующегося наличием Т-клеток, и, (б) если указанный индивидуум имеет воспалительное заболевание, характеризуется наличием указанных Т-клеток, введение указанному индивидууму эффективной дозы соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении указанные Т-клетки могут быть активированными и/или пролиферирующими Т-клетками, $CD4^+$ Т-клетками, провоспалительными Т-клетками, проникающими в ткани Т-клетками и/или Т-клетками, экспрессирующими HLA-cw3 и/или HLA-cw4. В одном воплощении указанное соединение представляет собой анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела. В одном воплощении изобретения способ лечения аутоиммунного заболевания у индивидуума может включать (а) определение наличия у указанного индивидуума аутоиммунного заболевания, характеризующегося наличием Т-клеток, и, (б) если указанный индивидуум имеет аутоиммунное заболевание, характеризуется наличием указанных Т-клеток, введение указанному индивидууму эффективной дозы соединения, которое ингибирует полипептиды KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении указанные Т-клетки могут быть активированными и/или пролиферирующими Т-клетками, $CD4^+$ Т-клетками, провоспалительными Т-клетками, проникающими в ткани Т-клетками и/или Т-клетками, экспрессирующими HLA-cw3 и/или HLA-cw4. В одном воплощении указанное соединение представляет собой анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела.

В одном воплощении способ лечения индивидуума, имеющего воспалительное заболевание, в частности, развившееся воспалительное заболевание, или испытывающего приступ, кризис, обострение или вспышку воспалительного заболевания, может включать введение индивидууму соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении способ лечения индивидуума, имеющего аутоиммунное заболевание, в частности, развившееся аутоиммунное заболевание, или испытывающего приступ, кризис, обострение или вспышку аутоиммунного заболевания, включает введение индивидууму соединения, которое ингибирует полипептиды KIR2DL 1, 2 и/или 3. В одном воплощении указанное соединение представляет собой анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела.

В одном воплощении изобретения, способ лечения воспалительного заболевания может включать введение индивидууму соединения, которое ингибирует полипептиды KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении изобретения, указанное соединение представляет собой анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела. В одном воплощении способ лечения аутоиммунного заболевания может включать в себя введение соединения, которое ингибирует полипептиды KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении указанное соединение представляет собой анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела.

В одном воплощении изобретения, способ лечения индивидуума может включать (а) определение наличия у индивидуума воспалительного или аутоиммунного заболевания и, (б) если индивидуум имеет воспалительное или аутоиммунное заболевание, лечение индивидуума эффективным количеством соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3.

В одном воплощении способ лечения индивидуума может включать (а) определение наличия у индивидуума воспалительного или аутоиммунного заболевания, опосредованного, по меньшей мере частично Т-клетками, и, (б) если лицо имеет воспалительное или аутоиммунное заболевание, опосредованное, по меньшей мере частично, указанными Т-клетками, лечение индивидуума эффективным количеством соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3.

В одном воплощении изобретения способ лечения индивидуума может включать (а) оценку присутствия, стадии и/или развития воспалительного или аутоиммунного заболевания у индивидуума и (б) введение указанному индивидууму эффективной дозы соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3.

В одном воплощении изобретения способ лечения индивидуума может включать (а) определение наличия у указанного индивидуума развившегося воспалительного или аутоиммунного заболевания и, (б) если указанный индивидуум имеет развившееся воспалительное или аутоиммунное заболевания, введение указанному индивидууму эффективной дозы соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3.

В одном воплощении способ лечения индивидуума может включать (а) определения наличия у индивидуума приступа, кризиса, обострения или вспышки воспалительного заболевания и, (б) если указанный индивидуум страдает от приступа, кризиса, обострения или вспышки воспалительного заболевания, введение указанному индивидууму эффективной дозы соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3.

В одном воплощении изобретения соединение, которое ингибирует полипептиды KIR2DL1, 2 и/или 3, вводят в качестве монотерапии, т.е. используют в лечении в качестве единственного агента. Например, лекарственное средство может содержать соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или

3, свободное от любых других фармацевтические активных агентов, и/или никакие дополнительные фармацевтические активные агенты не используют для лечения индивида от конкретного состояния заболевания. In vitro соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, может быть использовано без добавления или присутствия других активных агентов.

В одном из вариантов способов лечения по настоящему изобретению соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, может быть введено в комбинации со вторым терапевтическим агентом, т.е. до, одновременно или после второго терапевтического агента.

В одном воплощении изобретения соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, может быть введено в комбинации со вторым терапевтическим агентом, необязательно с любым агентом, обычно используемым в лечении конкретного заболевания. Предпочтительно, чтобы второй агент представлял собой агент, отличный от терапевтического антитела, которое индуцирует через ADCC гибель клеток, экспрессирующих антиген, с которым связывается второй агент. Предпочтительно, чтобы второй терапевтический агент представлял собой агент, отличный от антитела, имеющего изотип IgG1 или IgG3, действие которого включает индукцию ADCC по отношению к клетке, с которой связывается антитело. В одном воплощении изобретения второй агент может представлять собой антитело, обладающее константной областью изотипа IgG4, или фрагмент антитела (например, Fab или F $(ab')_2$ фрагмент). В одном воплощении изобретения второй агент может представлять собой антитело, связанное с цитотоксическим фрагментом. В одном воплощении изобретения второй агент может быть полипептидом, не являющимся антителом. В одном воплощении изобретения второй терапевтический агент может быть синтетическим низкомолекулярным агентом. В другом воплощении изобретения второй терапевтический агент может быть низкомолекулярным химиотерапевтическим средством. В еще одном воплощении изобретения второй терапевтический агент может быть DMARD.

Необязательно, в некоторых методах лечения методы могут дополнительно включать в себя введение индивидууму DMARD. В одном воплощении изобретения, в зависимости от метода лечения способ лечения индивидуума, имеющего аутоиммунное или воспалительное заболевание, может включать введение индивидууму (а) эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, и (б) DMARD.

Предпочтительно, чтобы соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3 и модулирует NK-клеточную цитотоксичность, приводило только к ингибированию указанных полипептидов KIR2DL1, 2 и/или 3. Предпочтительно, чтобы соединение могло содержать антитело, которое связывается с полипептидами KIR2DL1, 2 и/или 3.

В одном воплощении изобретения способ определения пригодности лечения соединением, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, для индивидуума, может включать в себя определение наличия у индивидуума развившегося воспалительного заболевания, наличие у индивидуума приступов, кризисов, обострений или вспышек заболевания или наличие у индивидуума заболевания, характеризующегося наличием Т-клеток, например активированных и/или пролиферирующих Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, провоспалительных Т-клеток, проникающих в ткани Т-клеток, и/или Т-клеток, экспрессирующих HLA-cw3 и/или HLA-cw4. В одном воплощении изобретения способ определения пригодности лечения соединением, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, для индивидуума, может включать в себя определениея наличия у указанного индивидуума развившегося аутоиммунного заболевания, наличие у индивидуума приступов, кризисов, обострений или вспышек заболевания или наличие у индивидуума заболевания, характеризующегося наличием Т-клеток, например активированных и/или пролиферирующих Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, провоспалительных Т-клеток, проникающих в ткани Т-клеток, и/или Т-клеток, экспрессирующих HLA-cw3 и/или HLA-cw4.

В одном воплощении изобретения способ лечения аутоиммунного заболевания может включать введение индивидууму соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении указанное соединение представляет собой антитело, фрагмент антитела, пептид, гликоалкалоид, антисмысловую нуклеиновую кислоту, рибозим, ретиноид, аверим, низкомолекулярное соединение, или любую их комбинацию. В другом воплощении изобретения соединение представляет собой анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела. В одном воплощении индивидуум имеет аутоиммунное заболевание, опосредованное Т-клетками. В дополнительном воплощении изобретения аутоиммунным заболеванием может быть синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), приобретенная атрофия поджелудочной железы, острый передний увеит, острый рассеянный энцефаломиелит, острый подагрический артрит, острый геморрагический некротический лейкоэнцефалит, острый или хронический синусит, острый гнойный менингит (или другие воспалительные заболевания центральной нервной системы), острое тяжелое воспаление, болезнь Аддисона, адреналит, сахарный диабет, развивающийся у взрослых (диабет II типа), идиопатический гипопаратиреоз, развивающийся у взрослых (AOIH), агаммаглобулинемия, агранулоцитоз, васкулиты (включая васкулит больших сосудов (в том числе ревматическая полимиалгия и артрит гигантских клеток (артрит Такаясу)), аллергические состояния, аллергический контактный дерматит, аллергический дерматит, аллергический гранулематозный васкулит, аллергическая гиперчувствительность, аллергический неврит, аллергические реакции, гнездная алопеция, тотальная алопеция, синдром Альпорта, альвеолит (например, аллергический альвеолит и фиброзирующий альвеолит), болезнь

Альцгеймера, амилоидоз, амилотрофический боковой склероз (АБС, болезнь Лу Геринга), расстройства, связанные с эозинофилами (например, эозинофилия), анафилаксия, болезнь Бехтерева, ангиэктазия, антитело- опосредованный нефрит, анти-ОВМ/анти-ТВМ нефрит, комплекс антиген-антитело-опосредованные заболевания, синдром Гудпасчера, синдром антифосфолипидных антител, антифосфолипидный синдром (АФС), афты, афтозный стоматит, апластическая анемия, аритмия, атеросклероз, атеросклеротические расстройства, артрит (например, ревматоидный артрит, такой как острый артрит, хронический ревматоидный артрит), хронический прогрессирующий артрит, деформирующий артрит, аскаридоз, аспергиллома (или гранулемы, содержащие эозинофилы), аспергиллез, аспермиогенез, астма (например, бронхиальная астма, а также аутоиммунная астма), атаксия-телеангиэктазия, атаксический склероз, атеросклероз, аутизм, аутоиммунные ангионевротический отек, аутоиммунная апластическая анемия, аутоиммунный атрофическийо гастрит, аутоиммунный диабет, аутоиммунное заболевание яичек и яичников, включая аутоиммунный орхит и оофорит, аутоиммунные расстройства синтеза коллагена, аутоиммунная вегетативная дистония, аутоиммунные заболевания уха (например, аутоиммунные заболевания внутреннего уха (AGED)), аутоиммунные эндокринные заболевания, включая тиреоидит, такой как аутоиммунный тиреоидит, аутоиммунная энтеропатия, аутоиммунная дисфункция половых желез, аутоиммунная потеря слуха, аутоиммунный гемолиз, аутоиммунный гепатит, аутоиммунные гепатологические расстройства, аутоиммунная гиперлипидемия, аутоиммунный иммунодефицит, аутоиммунные заболевания внутреннего уха (AIED), аутоиммунный миокардит, аутоиммунная нейтропения, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунная полиэндокринопатия, аутоиммунный полигландулярный синдром I типа, аутоиммунная ретинопатия, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура (А 111), аутоиммунные заболевания щитовидной железы, аутоиммунная крапивница, аутоиммунно-опосредованные заболевания желудочно-кишечного тракта, аксональные и нейрональные невропатии, болезнь Бало, болезнь Бехчета, семейное доброкачественное, ишемически-реперфузионное повреждение, доброкачественный лимфоцитарный васкулит, болезнь Бергера (IgA нефропатия), экзогенный аллергический альвеолит, слепота, болезнь Бека, облитерирующий бронхиолит (без пересадки) при NSIP (неспецифическая интерстициальная пневмония), бронхит, бронхо-пневматический аспергиллез, синдром Брутона, буллезный пемфигоид, синдром Каплана, кардиомиопатия, сердечно-сосудистая ишемия, синдром Кастельмана, глютеновая болезнь, целиакия, спру целиакия (глютеновая энтеропатия), дегенерация мозжечка, церебральная ишемия, заболевания, сопровождающиеся васкуляризацией, болезнь Шагаса, каналопатии (например, эпилепсия), каналопатии ЦНС, хориоретинит, хориоидит, аутоиммунные гематологические расстройства, хронический активный гепатит и аутоиммунный хронический активный гепатит, хронический контактный дерматит, хроническая эозинофильная пневмония, синдром хронической усталости, хронический гепатит, хронический аллергический пневмонит, хронический воспалительный артрит, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), хроническое стойкое воспаление, хронический кожно-слизистый кандидоз, хронические невропатии (например, IgM-полиневропатия или IgM-опосредованная невропатия), хроническая обструктивная болезнь легких, хроническое воспаление легких, хронический рецидивирующий мультифокальный остомиелит (CRMO), хронический тиреоидит (тиреоидит Хашимото) или подострый тиреоидит, синдром Черджа-Стросса, рубцовый пемфигоид / доброкачественный пемфигоид слизистой оболочки, воспалительные заболевания центральной нервной системы, васкулит ЦНС, целиакия, синдром Когана, синдром холодовой агглютинации, полипозный колит, колиты, такие как язвенный колит, коллагеновый колит, сопровождающийся инфильтрацией Т-клеток и хронические воспалительные реакции, врожденный порок сердца, врожденная краснуха, анемия с положительной пробой Кумбса, заболевания коронарных артерий, миокардит Коксаки, CREST синдром (кальциноз, синдром Рейно), болезнь Крона, криоглобулинемия, синдром Кушинга, циклит (например, хронический циклит, гетерохронный циклит, иридоциклит или циклит Фукса), муковисцидоз, цитокин-индуцированная токсичность, глухота, дегенеративный артрит, демиелинизирующие заболевания (например, аутоиммунные демиелинизирующие заболевания), демиелинизирующие невропатии, лихорадка денге, герпетиформный дерматит и атопический дерматит, в том числе контактный дерматит, дерматомиозит, дерматозы с острым воспалением, болезнь Девика (нейромиелит зрительного нерва), расстройства крупных артерий, вызванные диабетом, диабетическая нефропатия, диабетическая ретинопатия, синдром Даймонда-Блэкфена, диффузный интерстициальный легочный фиброз, дилатационная кардиомиопатия, дискоидная красная волчанка, заболевания, сопровождаемые диапедезом лейкоцитов, синдром Дресслера, контрактуры Дюпюитрена, инфекции эховирусом, экзема, в том числе сопровождаемая аллергическим или атопическим дерматитом, энцефалит, такой как энцефалит Расмуссена и энцефалит лимбической системы и/или ствола мозга, энцефаломиелит (например, аллергический энцефаломиелит или экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ)), внутриартериальная гиперплазия, эндокардит, эндокринная офтальмопатия, эндометриоз, эндомиокардиальный фиброз, факоанафилактический эндофтальмит, эндофтальмит, энтерит, аллергический синдром эозинофилии-миалгии, эозинофильный фасциит, эпидемический кератоконъюнктивит, приобретенный буллезный эпидермолиз (ПБЭ), эписклера, эписклеритом, вирусная инфекция Эпштейна-Барр, стойкая возвышающаяся эритема, мультиформная эритема, узловатая лепрозная эритема, узловатая эритема, эритробластоз пищевода зародыша, нарушения эзофагеальной моторики, криоглобулинемия смешанного типа, этмоидит, синдром Эванса, экспери-

ментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ), дефицит фактора VIII, "легкое фермера" или экзогенный аллергический альвелиолит, ревматическая лихорадка, синдром Фелти, фибромиалгия, фиброзирующий альвеолит, флариаз, фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), пищевые отравления, атрофия желудка, гигантоклеточный артериит (темпоральный артериит), гигантоклеточный гепатит, гигантоклеточная полимиалгия, гломерулонефритиды, гломерулонефрит (ГН) с и без нефротического синдрома, такой как хронический или острый гломерулонефрит (например, первичный ГН), синдром Гудпасчера, подагрический артрит, синдромы, связанные с переливанием гранулоцитов, гранулематоз, включая лимфоматоидный гранулематоз, гранулематоз с полиангиитом (GPA), гранулематозный увеит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, каплевидный псориаз, пароксизмальная гемоглобинурия, болезнь Хаммена-Рича, болезнь Хашимото, энцефалит Хашимото, тиреоидит Хашимото, гемохроматоз, гемолитическая анемия или иммунная гемолитическая анемия, в том числе аутоиммунная гемолитическая анемии (AIHA), гемолитическая анемия, гемофилия, пурпура Шенлейна-Геноха, герпес беременных, вирус иммунодефицита индивидуума (ВИЧ), гипералгезии, гипогаммаглобулинемия, гипогонадизм, гипопаратиреоз, идиопатический несахарный диабет, идиопатический паралич лицевого нерва, идиопатический гипотиреоз, идиопатическая IgA нефропатия, идиопатический мембранный ГН или идиопатическая мембранная нефропатия, идиопатический нефротический синдром, идиопатический легочный фиброз, идиопатическая спру, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP) IgA нефропатия, IgE-опосредованные заболевания (например, анафилаксии, аллергический и атопический ринит), IgG4-связанные склеротические заболевания, регионарный илеит, иммунокомплексный нефрит, иммунные ответы, связанные с острой и отсроченной гиперчувствительностью, опосредованные цитокинами и Т-лимфоцитами, иммунный ГН, иммунорегуляторные липопротеины, в том числе острый респираторный дистресс-синдром или респираторный дистресс-синдром взрослых (ARDS), миозит с тельцами включения, инфекционный артрит, бесплодие из-за анти-сперматозоидных антител, воспаление всего или части увеального тракта, воспалительные заболевания кишечника (IBD), воспалительные гиперпролиферативные заболевания кожи, воспалительная миопатия, инсулин-зависимый сахарный диабет (I типа), инсулит, интерстициальный цистит, интерстициальное заболевание легких, интерстициальный фиброз легких, ирит, ишемическое реперфузионное повреждение, воспаление суставов, ювенильный артрит, юношеский дерматомиозит, ювенильный диабет, юношеский сахарный диабет (I типа), включая инсулин-зависимый сахарный диабет у детей (IDDM), ювенильный ревматоидный артрит, синдром Кавасаки, сухой кератоконъюнктивит, трипаносомоз, синдром Ламберта-Итона, лейшманиоз, проказа, лейкопения, недостаточность адгезии лейкоцитов, лейкоцитокластический васкулит, лейкопения, красный плоский лишай, склероатрофический лишай, кератоконъюнктивит, линейный IgA дерматоз, линейные IgA заболевания (LAD), синдром Леффлера, волчаночный гепатит, волчанка (в том числе нефрит, энцефалит, педиатрическая, непочечная, внепочечная, дискоидная, алопеция), системная красная волчанка (СКВ), диссеминированная красная волчанка, артрит Лайма, болезнь Лайма, лимфоидная интерстициальная пневмония, малярия, мужское и женское аутоиммунное бесплодие, васкулит верхнечелюстной артерии, васкулит средних сосудов (в том числе болезнь Кавасаки и узелковый полиартрит), мембранный или мембранный пролиферативный ГН (MPGN), в том числе I типа и II типа, быстро прогрессирующий ГН, мембранный ГН (мембранные нефропатии), болезнь Меньера, менингит, микроскопический колит, микроскопический полиангиит, мигрень, нефропатия с минимальными изменениями, смешанные заболевания соединительной ткани (MCTD), инфекционный мононуклеоз, язва Морена, болезнь Муха-Габермана, мультифокальная моторная нейропатия, эндокринная множественная недостаточность, синдром множественного повреждения органов вследствие сепсиса, травмы или кровотечения, синдром множественного повреждения органов, рассеянный склероз (РС), такой, как спинно-оптический РС, эпидемический паротит, мышечные нарушения, миастения гравис, например, ассоциированная с тимомой миастения гравис, миокардит, миозит, нарколепсия, некротизирующий энтероколит и трансмуральный колит, аутоиммунные воспалительные заболевания кишечника, некротизирующий, кожный или аллергический васкулит, неонатальный волчаночный синдром (НВС), нефроз, нефротический синдром, неврологические заболевания, нейромиелит зрительного нерва (Девика), нейромиелит зрительного нерва, нейромиотония, нейтропения, доброкачественный лимфоцитоз, негранулематозный увеит, доброкачественные тимомы, глазные и орбитальные воспалительные заболевания, глазной рубцовый пемфигоид, оофорит, симпатическая офтальмия, опсоклонус миоклонус синдром (OMS) опсоклонус или опсоклонус миоклонус синдром (OMS), и сенсорная невропатия, неврит зрительного нерва, гранулематозный орхит, остеоартроз, палиндромный ревматизм, панкреатит, панцитопения, PANDAS (детское аутоиммунное психоневрологическое расстройство, ассоциированное со стрептококком), паранеопластическая дегенерация мозжечка, паранеопластический синдром, паранеопластические синдромы, в том числе неврологические паранеопластические синдромы (например, миастенический синдром Ламберта-Итона или синдром Ламберта-Итона), паразитарные заболевания, такие как лейшманиоз, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), синдром Парри-Ромберга, парспланит (периферический увеит), синдром Персоннейджа-Тернера, парвовирусные инфекции, пемфигоид, такой как буллезный и кожный пемфигоид, пузырчатка (в том числе обыкновенная пузырчатка), волчанковая пузырчатка, листовидная пузырчатка, пемфигоид слизистых, пузырчатка, язвенная болезнь, периодический паралич, периферическая невропатия, перивенозной энце-

фаломиелит, злокачественная анемия (пернициозная анемия), злокачественная анемия, факоантигенный увеит, цирроз легкого, синдром Кроу-Фуказа (POEMS), узелковый полиартрит, первичный хронический полиартрит I, II и III типа, полихондрит (например, устойчивый или рецидивирующий полихондрит), полиэндокринное аутоиммунное заболевание, полиэндокринная недостаточность, полигландулярный синдром (например, аутоиммунный полигландулярный синдром (или полигландулярный эндокринопатический синдром)), ревматическая полимиалгия, полимиозит, полимиозит/дерматомиозит, полинейропатия, острый полирадикулоневрит, посткардиотомный синдром, задний увеит или аутоиммунный увеит, постинфарктный синдром, посткардиотомный синдром, постстрептококковый нефрит, поствакцинальный синдром, пресенильное слабоумие, первичный билиарный цирроз, первичный гипотиреоз, первичная идиопатическая микседема, первичный лимфоцитоз, включающий моноклональный В-клеточный лимфоцитоз (например, доброкачественную моноклональную гаммапатию и моноклональную гаммапатию неопределенного значения, MGUS), первичная микседема, первичный прогрессирующий РС (PPMS) и возвратно-ремиттирующий РС (RRMS), первичный склерозирующий холангит, прогестероновый дерматит, прогрессирующий системный склероз, пролиферативный артрит, псориаз, такой как пятнистый псориаз, псориаз, псориатический артрит, легочно-альвеолярный протеиноз, эозинофильный инфильтрат легкого, истинная эритроцитарная анемия или аплазия (PRCA), гнойный или безгнойный синусит, пустулезный псориаз и псориаз ногтей, пиелит, гангренозная пиодермия, тиреоидит Кервена, феномен Рейно, реактивный артрит, привычный выкидыш, снижение артериального давления, рефлекторная симпатическая дистрофия, устойчивое спру, болезнь или синдром Рейтера, рецидивирующий полихондрит, реперфузионное повреждение миокарда или других тканей, реперфузия травмы, респираторный дистресс-синдром, синдром беспокойных ног, аутоиммунные заболевания сетчатки, забрюшинный фиброз, синдром Рейно, ревматические заболевания, ревматизм, ревматическая лихорадка, ревматоидный артрит, ревматоидный спондилит, инфекция вирусом краснухи, синдром Сэмптера, саркоидоз, шистосомоз, синдром Шмидта, SCID и связанные с вирусом Эпштейн-Барр заболевания, заболевания склеры, склерит, склеродактилия, склеродермия (включая системную склеродермию), склерозирующий холангит, диссеминированный склероз, склероз, такой как системный склероз, сенсоневральная потеря слуха, серонегативные спондилоартриты, синдром Шихана, синдром Шульмана, силикоз, синдром Шегрена, аутоиммунность к сперме и яичкам, клиновидной синусит, синдром Стивенса-Джонсона, синдром мышечной скованности, подострый бактериальный эндокардит (SBE), подострая кожная красная волчанка, внезапная потеря слуха, синдром Сусака, хорея Сиденхема, симпатическая офтальмия, системная красная волчанка (СКВ) или системная эритематозная волчанка (например, кожная СЭВ), системный некротический васкулит и ANCA-ассоциированный васкулит, такой как васкулит или синдром Черджа-Стросса (CSS), сухотка спинного мозга, артериит Такаясу, телеангиэктазия, височный артериит/гигантоклеточный артериит, облитерирующий тромбангиит, тромбоцитопения (например, развивающаяся у больных инфарктом миокарда), в том числе тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP) и аутоиммунная или иммунная тромбоцитопения, такая как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP), включая хроническую или острую ITP, тромбоцитопеническая пурпура (TP), тиреотоксикоз, повреждение тканей, синдром Толоса - Ханта, токсический эпидермальный некролиз, синдром токсического шока, реакции на переливание, транзиторная гипогаммаглобулинемия новорождённых, поперечный миелит, поперечный миелит, тропическая легочная эозинофилия, туберкулез, язвенный колит, недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), крапивница (например, хроническая аллергическая крапивница и хроническая идиопатическая крапивница, в том числе хроническая аутоиммунная крапивница), увеит (например, передний увеит), увеоретинит, вальвулит, сосудистая дисфункция, васкулит, позвоночный артрит, везикуло-буллезный дерматоз, витилиго, гранулематоз Вегенера (в настоящее время известен как гранулематоз с полиангиитом (GPA), синдром Вискотта-Олдрича, и сцепленный с Х-хромосомой гипер IgM синдром.

В одном воплощении способ лечения воспалительного заболевания может включать введение индивидууму соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении указанное соединение представляет собой антитело, фрагмент антитела, пептид, гликоалкалоид, антисмысловую нуклеиновую кислоту, рибозим, ретиноид, аверим, низкомолекулярное соединение или любую их комбинацию. В другом воплощении соединение представляет собой анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела. В одном воплощении индивидуум имеет воспалительное заболевание, опосредованное Т-клетками. В еще одном воплощении изобретения воспалительное заболевание представляет собой ревматические заболевания (например, ревматоидный артрит, остеоартрит, псориатический артрит), спондилоартропатии (например, анкилозирующий спондилит, реактивный артрит, синдром Рейтера), кристаллические артропатии (например, подагра, псевдоподагра, расстройство осаждения пирофосфата кальция), рассеянный склероз, болезнь Лайма, ревматическую полимиалгию, заболевания соединительных тканей (например, системная красная волчанка, системный склероз, полиомиозит, дерматомиозит, синдром Шегрена); васкулиты ((например, нодозный полиартериит, гранулематоз Вегенера, синдром Черга-Штраусса); воспалительные состояния, включая последствия травм или ишемии, саркоидоз; сосудистые заболевания, включая атеросклеротическую болезнь сосудов, атеросклероз и окклюзионные болезни сосудов (например, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, сердечный приступ, заболевания

периферических сосудов) и рестеноз в стенте сосудов; заболевания глаз, включая увеит, заболевания роговицы, ирит, иридоциклит и катаракту.

Воспалительные состояния включают рефлюкс/изжогу, акне, юношеские угри, аллергию и гиперчувствительность, болезнь Альцгеймера, астму, атеросклероз и сосудистый облитерирующий эндартериит (например, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, инсульт, заболевания периферических сосудов) и рестеноз в стенте сосудов, аутоиммунные заболевания, бронхит, рак, кардит, катаракту, целиакию, хронические боли, хронический простатит, цирроз, колит, заболевания соединительной ткани (например, системная красная волчанка, системный склероз, полимиозит, дерматомиозит, синдром Шегрена), заболевания роговицы, болезнь Крона, кристаллические артропатии (например, подагра, псевдоподагра, расстройство осаждения пирофосфата кальция), деменция, дерматит, диабет, сухость глаз, экзема, эдема, эмфизема, фибромиалгия, гастроэнтерит, гингивит, гломерулонефрит, болезни сердца, гепатит, высокое кровяное давление, гиперчувствительность, воспалительные заболевания кишечника, воспалительные состояния, включая последствия травмы или ишемии, инсулинорезистентность, интерстициальный цистит, иридоциклит, ирит, боли в суставах/артрит/ревматоидный артрит, болезнь Лайма, метаболический синдром (синдром X), рассеянный склероз, миозит, нефрит, ожирение, заболевания глаз, в том числе увеит, остеопения, остеопороз, болезнь Паркинсона, воспалительные заболевания таза, пародонтоз, полиартериит, полихондрит, ревматическая полимиалгия, псориаз, реперфузионное повреждение, ревматический артрит, ревматические заболевания (например, ревматоидный артрит, остеоартрит, псориатический артрит), ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермия, синусит, синдром Шегрена, слизистый колит, спондилоартропатии (например, болезнь Бехтерева, реактивный артрит, синдром Рейтера), системный кандидоз, тендинит, отторжение трансплантата, инфекции мочевыводящих путей, вагинит, сосудистые заболевания, включая атеросклеротические сосудистые заболевания, васкулиты (например, узелковый полиартрит, гранулематоз Вегенера, синдром Черджа-Стросса) и васкулит.

В другом воплощении соединение может быть анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителом. В одном воплощении антитело может быть химерным, гуманизированным, антиидиотипическим, одноцепочечным, бифункциональным или ко-специфическим. В другом воплощении антитело может содержать аминокислотную последовательность V_L, соответствующую аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 3 или 5. В одном воплощении остатки 3, 4, 9, 24, 32, 41, 47, 50, 55, 71 и 74 из SEQ ID NO: 3 могут представлять собой Q, L, S, R, A, G, L, D, E, F и A соответственно. В одном воплощении антитело может содержать аминокислотную последовательность V_H, соответствующую аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 4 или 6. В другом случае, остатки 3, 4, 9, 24, 32, 41, 47, 50, 55, 71 и 74 из SEQ ID NO: 3 могут представлять собой R, M, F, W, Y, A, F, Y, Q, Y и T соответственно.

В одном воплощении изобретения анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитело может содержать последовательность CDR1 легкой цепи, соответствующую остаткам 24-34 из SEQ ID NO: 1; последовательность CDR2 легкой цепи, соответствующую остаткам 50-56 из SEQ ID NO: 1; последовательность CDR3 легкой цепи, соответствующую остаткам 89-97 из SEQ ID NO: 1; последовательность CDR1 тяжелой цепи, соответствующую остаткам 31-35 SEQ ID NO: 2; последовательность CDR2 тяжелой цепи, соответствующую остаткам 50-65 из SEQ ID NO: 2, или последовательность CDR3 тяжелой цепи, соответствующую остаткам 99-112 из SEQ ID NO: 2.

В одном воплощении изобретения анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело может содержать последовательность CDR1 легкой цепи, соответствующую остаткам 24-34 из SEQ ID NO: 3; последовательность CDR2 легкой цепи, соответствующую остаткам 50-56 из SEQ ID NO: 3; последовательность CDR3 легкой цепи, соответствующую остаткам 89-97 из SEQ ID NO: 3; последовательность CDR1 тяжелой цепи, соответствующую остаткам 31-35 SEQ ID NO: 4; последовательность CDR2 тяжелой цепи, соответствующую остаткам 50-66 из SEQ ID NO: 4; или последовательность CDR3 тяжелой цепи, соответствующую остаткам 99-113 из SEQ ID NO: 4.

В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело может содержать V_L и V_H последовательности, содержащие аминокислотные последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно или SEQ ID NO: 5 и 6 соответственно.

В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело, используемое в предлагаемых способах лечения, может содержать области CDR следующим образом: последовательность аминокислот CDR1 легкой цепи, соответствующую остаткам около 24-34 из SEQ ID NO: 1; аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи, соответствующую остаткам около 50-56 из SEQ ID NO: 1; последовательность аминокислот CDR3 легкой цепи, соответствующую остаткам около 89-97 из SEQ ID NO: 1; аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи, соответствующую остаткам около 31-35 из SEQ ID NO: 2; последовательность аминокислот CDR2 тяжелой цепи, соответствующую остаткам около 50-65 из SEQ ID NO: 2; или последовательность аминокислот CDR3 тяжелой цепи, соответствующую остаткам около 99-112 из SEQ ID NO: 2.

В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела, используемые в предлагаемых способах лечения, могут содержать области CDR следующим образом: последовательность аминокислот CDR1 легкой цепи, соответствующую остаткам около 24-34 из SEQ ID NO: 3; аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи, соответствующую остаткам около 50-56 из SEQ ID NO: 3; последовательность

аминокислот CDR3 легкой цепи, соответствующую остаткам около 89-97 из SEQ ID NO: 3; аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи, соответствующую остаткам около 31-35 из SEQ ID NO: 4; последовательность аминокислот CDR2 тяжелой цепи, соответствующую остаткам около 50-66 из SEQ ID NO: 4; или последовательность аминокислот CDR3 тяжелой цепи, соответствующую остаткам около 99-113 из SEQ ID NO: 4.

В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела, используемые в предлагаемых способах лечения, могут содержать аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи, состоящую, по существу, из остатков 24-34 из SEQ ID NO: 1; аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи, состоящую, по существу, из остатков 50-56 из SEQ ID NO: 1; аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи, состоящую, по существу, из остатков 89-97 из SEQ ID NO: 1; последовательность аминокислот CDR1 тяжелой цепи, состоящую, по существу, из остатков 31-35 SEQ ID NO: 2; аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи, состоящую, по существу, из остатков 50-65 из SEQ ID NO: 2; или последовательность аминокислот CDR3 тяжелой цепи, состоящую, по существу, из остатков 99-112 из SEQ ID NO: 2.

В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела, используемые в предлагаемых способах лечения, могут содержать CDR области следующим образом: последовательность аминокислот CDR1 легкой цепи, состоящую, по существу, из остатков 24-34 из SEQ ID NO: 3; аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи, состоящую, по существу, из остатков 50-56 из SEQ ID NO: 3; аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи, состоящую, по существу, из остатков 89-97 из SEQ ID NO: 3; аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи, состоящую, по существу, из остатков 31-35 из SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи, состоящую, по существу, из остатков 50-66 из SEQ ID NO: 4; или последовательность аминокислот CDR3 тяжелой цепи, состоящую, по существу, из остатков 99-113 из SEQ ID NO: 4.

В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела, используемые в предлагаемых способах лечения, могут связываться с эпитопом в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9 или 10. В одном воплощении анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела по изобретению могут связываться с KIR2DL1 в пределах области, определяемой по меньшей мере одним из аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из остатков 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 одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела могут связываться с KIR2DL1 и KIR2DL2/3 в области, определяемой по меньшей мере одним из аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из остатков 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 одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела или их фрагменты, которые могут быть использованы в предлагаемых способах лечения, могут быть напрямую или не напрямую конъюгированы с меткой, цитотоксическим агентом, терапевтическим агентом или иммунодепрессантом. В одном воплощении метка может быть хемилюминесцентный меткой, парамагнитной меткой, контрастным агентом для МРТ, флуоресцентной меткой, биолюминесцентной меткой или радиоактивной меткой. В одном воплощении парамагнитной меткой может быть алюминий, марганец, платина, кислород, лантан, лютеций, скандий, иттрий или галлий. В одном воплощении цитотоксическим агентом может быть компонент, который ингибирует синтез ДНК, РНК или белка, радионуклид, или белок, ингибирующий работу рибосом. В одном воплощении цитотоксическим агентом может быть ^{212}Bi, ^{131}I, ^{188}Re, ^{90}Y, виндезин, метотрексат, адриамицин, цисплатин, противовирусный белок лаконоса, экзотоксин А пвсевдомонад (Pseudomonas), рицин, дифтерийный токсин, цепь А рицина, или цитотоксический фермент фосфолипаза.

В одном воплощении анти-KIR2DL 1, 2 или 3 антитела, используемые в способах лечения по изобретению, блокируют или нейтрализуют ингибирование NK. В одном воплощении анти-KIR2DL 1, 2 или 3 антитела могут связываться по меньшей мере с одним из KIR2DL1, 2 или 3 и нейтрализовать KIR2DL1, 2 и/или 3-опосредованное ингибирование цитотоксичности NK-клеток. В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 или 3 антитела могут приводить по меньшей мере примерно к 20%-ному увеличению NK-клеточного специфического лизиса клеток-мишеней NK-клеток.

В одном воплощении анти-KIR2DLl, 2 или 3 антитела, используемые в предлагаемых способах лечения, могут конкурировать за связывание с той же антигенной детерминантой областью, которую связывают моноклональные антитела 7F9-1, DF200 и/или NKVSF1. В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 или 3 антитела, используемые в предлагаемых способах лечения, могут связываться по меньшей мере с двумя ингибирующими рецепторами KIR на поверхности NK-клеток. В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 или 3 антитела, используемые в способе лечения согласно изобретению, могут связывать с общей антигенной детерминантной областью рецепторов KIR2DL индивидуума. В одном воплощении анти-KIR2DL 1, 2 или 3 антитела, используемые в предлагаемых способах лечения, могут связываться с KIR2DL1, 2 и/или 3-рецепторами. В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 или 3 антитела, используемые в предлагаемых способах лечения, имеют сродство к KIR2DL1, 2 и/или 3 по меньшей мере от около 10^4 до около 10^{10} M^{-1}. В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 или 3 антитела, используемые в предлагаемых способах лечения, могут иметь сродство к KIR2DL1, 2 и/или 3 по меньшей мере от около 10^7 до около

10^9 M^{-1}. В одном воплощении анти-KIR2DLl, 2 или 3 антитела, используемые в предлагаемых способах лечения, могут проявлять KIR-связывание с константой диссоциации менее чем около 100 нМ. В одном воплощении анти-KIR2DL 1, 2, или 3 антитела могут перекрестно реагировать с KIR 2DL1 плюс 2DL2/3, 3DL1 плюс 3DL2, 2DL1 (и 2DL2/3) плюс 2DS4 и 2DL1 (и 2DL2/3), но не 2D24. В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 или 3 антитела могут представлять собой антитела DF200, 1-7F9 или NKVSF1.

В одном воплощении соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, используемое в предлагаемых способах лечения, можно вводить в виде монотерапии. В одном воплощении соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, используемое в предлагаемых способах лечения, можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим агентом. В одном воплощении второй терапевтический агент может быть агентом, который уменьшает воспаление. В одном воплощении второй терапевтический агент может быть низкомолекулярным химическим агентом. В одном воплощении второй терапевтический агент может быть DMARD, необязательно анти-ФНО антителом, низкомолекурным ингибитором тирозинкиназы, или метотрексатом (MTX). В одном воплощении второй терапевтический агент может быть агентом, отличным от антитела, имеющего IgG1 или IgG3 изотип.

В одном воплощении соединение, которое ингибирует полипептиды KIR2DL1, 2 и/или 3, которое используют в предлагаемых способах лечения, может быть анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителом, обладающим способностью блокировать или нейтрализовать KIR2DL1, 2 и/или 3-опосредованное ингибирование NK и тем самым усиливать активность NK-клеток против блокированных в ином случае клеток-мишеней. В одном воплощении антитело может быть анти-KIR антителом, которое может связывать KIR2DL1 и KIR2DL2/3. В одном воплощении антитело анти-KIR может конкурировать с 1-7F9 за связывание с полипептидами KIR2DL1, 2 и/или 3.

В одном воплощении антитело может быть 1-7F9 антителом. В одном воплощении антитело может содержать V_L и V_H домены 1-7F9. В одном воплощении антитело может содержать CDR V_L и V_H от 1-7F9. В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела можно вводить в виде фармацевтически приемлемой композиции, которая может содержать эффективное количество анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител. В одном воплощении композиция может быть свободна от любых других фармацевтически активных агентов.

В одном воплощении анти-KIR2DLl, 2 и/или 3 антитела можно вводить в количестве, в результате которого достигается полное насыщение KIR2DL1, 2 и/или 3 на NK-клетках в течение периода по меньшей мере около 1 недели. В одном воплощении анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела могут быть введены в количестве, в результате которого достигается полное насыщение KIR2DL1, 2 и/или 3 на NK-клетках в течение по меньшей мере около 2 недель. В одном воплощении анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела можно вводить в количестве, в результате которого достигается полное насыщение KIR2DL1, 2 и/или 3 на NK- клетках в течение по меньшей мере около 1 месяца. В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела можно вводить несколько раз с частотой дозирования около одного введение каждые 2 недели. В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела можно вводить несколько раз с частотой дозирования один раз в каждом месяце. В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела можно вводить несколько раз с частотой дозирования около одного раза каждые 2 месяца или одного раза в течение более чем 2 месяцев.

В одном воплощении настоящее изобретение относится к композиции для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, которая может содержать антитела против KIR2DL1 и, необязательно, другой активный агент. В другом воплощении композиция может содержать анти-KIR2DL2 антитела. В другом воплощении композиция для использования в настоящем изобретении может содержать анти-KIR2DL3 антитела и, необязательно, другой активный агент. В дополнительном воплощении композиция может содержать анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела и дополнительно еще один активный агент.

В одном воплощении композиция для применения для лечения аутоиммунного заболевания может содержать эффективное количество антитела против KIR2DL1. В одном воплощении композиция для применения для лечения аутоиммунного заболевания согласно изобретению может содержать эффективное количество анти-KIR2DL2 антитела. В одном воплощении композиция для применения для лечения аутоиммунного заболевания в соответствии с изобретением может содержать эффективное количество анти-KIR2DL3 антитела. В еще одном воплощении композиция для применения для лечения аутоиммунного заболевания может включать эффективное количество анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител.

В одном воплощении композиция для применения для лечения воспалительного заболевания в соответствии с изобретением может содержать анти-KIR2DL1 антитела. В одном воплощении композиция для применения для лечения воспалительного заболевания в соответствии с изобретением может содержать анти-KIR2DL2 антитела. В одном воплощении композиция для применения для лечения воспалительного заболевания в соответствии с изобретением может содержать анти-KIR2DL3 антитела. В еще одном воплощении композиция для применения для лечения воспалительного заболевания в соответствии с изобретением может содержать анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела.

В одном воплощении настоящее изобретение относится к способу получения антител, включающему (а) иммунизацию животных полипептидами KIR2DL1, 2 и/или 3; (б) удаление у указанного животного селезенки и приготовление суспензии отдельных клеток; (в) слияние клеток селезенки с миеломными

клетками; (г) культивирование гибридных клеток гибридомы в селективной среде; (д) культивирование полученных гибридом; (е) скрининг на продукцию специфичных антител и (г) выбор гибридом, которые продуцируют нужные антитела.

В одном воплощении настоящее изобретение относится к способу получения антитела для лечения воспалительного или аутоиммунного заболевания, включающему (а) иммунизацию млекопитающего, отличного от человека иммуногеном, содержащим полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3; (б) селекцию антител от указанного иммунизированного млекопитающего, где указанное антитело связывается с полипептидами KIR2DL1; 2 и/или 3, и (с) отбор антител (б), потенцирующих устранение NK-клетками Т-клеток.

В одном воплощении настоящее изобретение относится к способу получения антител для лечения воспалительного или аутоиммунного заболевания, включающему (а) получение библиотеки антител с помощью метода фагового дисплея, (б) библиотеку, отличающуюся тем, что указанные антитела связываются с полипептидами KIR2DL1, 2 и/или 3 и (с) отбор антител (б), потенцирующих устранение NK-клетками Т-клеток.

В другом воплощении любой из различных вышеописанных способов также может быть необязательно модифицирован путем применения лечения одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, например низкомолекулярными агентами, DMARD (предпочтительно, кроме антител, основной механизм действия может состоять в активации ADCC).

В одном воплощении настоящее изобретение относится к способу лечения аутоиммунного заболевания и может включать введение индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении предложенный способ лечения воспалительного заболевания может включать введение индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении способ устранения или уменьшения количества Т-клеток, участвующих в развитии состояния заболевания, может включать контакт упомянутой Т-клетки с соединением, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, в присутствии клеток, которые экспрессируют полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении клетки, которые экспрессируют полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, являются NK-клетками. В одном воплощении это осуществляется in vivo. В одном воплощении это осуществляется ex vivo. В одном воплощении Т-клетки включают в себя одну или более подгрупп провоспалительных, активированных и/или пролиферирующих Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, проникающих в ткани Т-клеток и/или Т-клеток, которые экспрессируют HLA-cw 3 и/или HLA-cw4.

В другом воплощении способ устранения или уменьшения количества Т-клеток, которые вовлечены в патологию воспалительного заболевания, может включать введение индивидууму, имеющему воспалительное заболевание, такого количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, которое эффективно для уменьшения количества указанных Т-клеток. В другом воплощении способ устранения или уменьшения количества Т-клеток, которые вовлечены в патологию аутоиммунного заболевания, может включать введение индивидууму, имеющему аутоиммунное заболевание, количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, эффективного для уменьшения количества указанных Т-клеток. В одном воплощении Т-клетки включают активированные и/или пролиферирующие Т-клетки, $CD4^+$ Т-клетки, провоспалительные Т-клетки и/или Т-клетки, экспрессирующие HLA-cw3 и/или HLA-cw4. В одном воплощении Т-клетки включают в себя одну или более из следующих подгрупп: циркулирующие (в кровотоке), находящиеся в больных или воспаленных тканях, проникающие в ткани Т-клетки, Т-клетки, которые проникли в больные ткани, находятся в синовиальных суставных тканях или синовиальной жидкости или находятся в центральной нервной системе, толстой кишке, или кожной ткани. В одном воплощении индивидуум имеет заболевание, опосредованное, по меньшей мере частично, указанными Т-клетками.

В другом воплощении способ устранения или уменьшения количества активированных и/или пролиферирующих Т-клеток, которые вовлечены в патологию воспалительного или аутоиммунного заболевания, in vivo может включать введение индивидууму, имеющему воспалительное или аутоиммунное заболевание, количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, эффективного для уменьшения количества указанных Т-клеток. В другом воплощении способ устранения или уменьшения количества $CD4^+$ Т-клеток, которые вовлечены в патологии воспалительного или аутоиммунного заболевания, может включать введение индивидууму, имеющему воспалительное или аутоиммунное заболевание, количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, эффективного для уменьшения количества указанных Т-клеток. В другом воплощении способ устранения или уменьшения количества провоспалительных Т-клеток может включать введение индивидууму, имеющему воспалительное или аутоиммунное заболевание, количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, эффективного для снижения количества указанных Т-клеток. В одном воплощении заболевание опосредовано, по меньшей мере частично, указанными Т-клетками.

В другом воплощении способ устранения или уменьшения количества проникающих в ткани Т-клеток может включать в себя введение индивидууму, имеющему воспалительное или аутоиммунное заболевание, количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, эффективного для уменьшения количества упомянутых Т-клеток. В одном воплощении заболевание опосредовано, по

меньшей мере, частично, указанными Т-клетками. В одном воплощении проникающие Т-клетки включают одну или более из следующих подгрупп: клетки, которые проникли в больные ткани, клетки, которые проникли в синовиальные суставные ткани или синовиальные жидкости, или клетки, которые проникли в центральную нервную систему, толстую кишку или кожную ткань.

В другом воплощении способ для устранения или уменьшения количества Т-клеток, экспрессирующих HLA-cw3 и/или HLA-cw4, может включать введение индивидууму, имеющему воспалительное или аутоиммунное заболевание, количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, эффективного для уменьшения количества указанных Т-клеток. В одном воплощении Т-клетки, по меньшей мере частично, участвуют в развитии указанного заболевания.

В другом воплощении предложенный способ лечения воспалительного заболевания может включать (а) определение наличия у индивидуума воспалительного или аутоиммунного заболевания и, (б) если индивидуум имеет воспалительное или аутоиммунное заболевание, лечение индивидуума эффективным количеством соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3.

В другом воплощении предложенный способ лечения аутоиммунного заболевания может включать (а) определение наличия у индивидуума воспалительного или аутоиммунного заболевания и, (б) если индивидуум имеет воспалительное или аутоиммунное заболевание, лечение индивидуума эффективным количеством соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3.

В другом воплощении предложенный способ лечения воспалительного заболевания может включать (а) определение наличие у индивидуума воспалительного заболевания, опосредованного, по меньшей мере частично, Т-клетками, и, (б) если индивидуум имеет воспалительное заболевание, опосредованное, по меньшей мере частично, упомянутыми Т-клетками, лечение индивидуума эффективным количеством соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении Т-клетки включают одну или более из следующих подгрупп: являются провоспалительными, активированными и/или пролиферирующими Т-клетками, циркулирующими в кровотоке или находящимися в больной или воспаленной ткани, $CD4^+$ Т-клетками, являются проникающими в ткани Т-клетками и/или экспрессируют HLA-cw3 и/или HLA-cw4.

В другом воплощении предложенный способ лечения аутоиммунного заболевания может включать (а) определение наличия у индивидуума аутоиммунного заболевания, опосредованного, по меньшей мере частично, Т-клетками, и, (б) если индивидуум имеет аутоиммунное заболевание, опосредованного в мере, частично упомянутыми Т-клетками, лечение индивидуума эффективным количеством соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении Т-клетки включают одну или более из следующих подгрупп: провоспалительные, активированные и/или пролиферирующие Т-клетки, циркулирующие в кровотоке или находящиеся в больной или воспаленной ткани, $CD4^+$ Т-клетки, проникающие в ткани Т-клетки, и/или Т-клетки, экспрессирующие HLA-cw3 и/или HLA-cw4.

В другом воплощении способ лечения воспалительного заболевания у индивидуума может включать (а) оценку наличия, стадии и/или развития воспалительного заболевания у индивидуума и (б) введение указанному индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении способ лечения аутоиммунного заболевания у индивидуума может включать (а) оценку наличия, стадии и/или развития аутоиммунного заболевания у индивидуума и (б) введение указанному индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении способ лечения может включать оценку наличия, стадии и/или развития заболевания у индивидуума, также может включать анализ уровней аутоантител, СРБ, любого протеолитического фермента, воспалительного медиатора или маркера постоянного воспаления. В одном воплощении, если индивидуум определяется как пригодный для лечения соединением, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, то проводят введение указанному индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении способ лечения воспалительного заболевания у индивидуума может включать (а) определение, имеет ли указанный индивидуум развившееся воспалительное заболевание, и, (б) если указанный индивидуум имеет развившееся воспалительное заболевание, введение указанному индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении способ для лечения аутоиммунного заболевания у индивидуума может включать (а) определение, имеет ли указанный индивидуум развившееся аутоиммунное заболевание и, (б) если указанный индивидуум имеет развившееся аутоиммунное заболевание, введение указанному индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении способ лечения воспалительного заболевания у индивидуума может включать (а) определение, испытывал ли указанный индивидуум приступы, кризис, обострение или вспышку воспалительного заболевания, и, (б) если указанный индивидуум испытывал приступ, кризис, обострение или вспышку воспалительного заболевания, введение указанному индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом случае способ лечения аутоиммунного заболевания у индивидуума может включать (а) определение, испытывал ли указанный индивидуум приступ, кризис, обострение или вспышку аутоиммунного заболевания, и, (б) если указанный индивидуум испытывал приступ, кризис, обострение или вспышку аутоиммунного заболевания, введение указанному индиви-

дууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении способ лечения воспалительного заболевания у индивидуума может включать (а) определение, имеет ли указанный индивидуум воспалительное заболевание, характеризующееся присутствием Т-клеток, и, (б) если указанный индивидуум имеет воспалительное заболевание, характеризующееся присутствием указанных Т-клеток, введение указанному индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении способ лечения аутоиммунного заболевания у индивидуума может включать (а) определение, имеет ли указанный индивидуум аутоиммунное заболевание, характеризующееся присутствием Т-клеток, и, (б) если указанный индивидуум имеет аутоиммунное заболевание, характеризующееся присутствием указанных Т-клеток, введение указанному индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3.

В одном воплощении Т-клетки могут быть активированными и/или пролиферирующими Т-клетками, $CD4^+$ Т-клетками, провоспалительными Т-клетками, проникающими в ткани Т-клетками и/или Т-клетками, экспрессирующими HLA-cw3 и/или HLA-cw4.

В одном воплощении настоящее изобретение описывает способ лечения индивидуума, имеющего приступ, кризис, обострение или вспышку воспалительного заболевания, который может включать введение индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении индивидуум имеет развившееся воспалительное заболевание. В другом воплощении способ лечения индивидуума, испытывающего приступ, кризис, обострение или вспышку аутоиммунного заболевания, может включать введение индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении индивидуум имеет аутоиммунное воспалительное заболевание. В другом воплощении способ лечения индивидуума может включать (а) определение наличия у индивидуума воспалительного или аутоиммунного заболевания и, (б) если индивидуум имеет воспалительное или аутоиммунное заболевание, лечение индивидуума эффективным количеством соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении способ лечения индивидуума может включать (а) определение наличия у индивидуума воспалительного или аутоиммунного заболевания, опосредованного, по меньшей мере частично, Т-клетками, и, (б) если индивидуум имеет воспалительное или аутоиммунное заболевание, опосредованное, по меньшей мере частично, упомянутыми Т-клетками, лечение индивидуума эффективным количеством соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении способ лечения индивидуума может включать (а) оценку наличия, стадии и/или развития воспалительного или аутоиммунного заболевания у индивидуума и (б) введение указанному индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении способ лечения индивидуума может включать (а) определение, имеет ли указанный индивидуум развившееся воспалительное или аутоиммунное заболевание, и, (б) если указанный индивидуум имеет развившееся воспалительное или аутоиммунное заболевание, введение указанному индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3.

В другом воплощении изобретения способ лечения индивидуума может включать (а) определение, испытывал ли упомянутый индивид приступ, кризис, обострение или вспышку воспалительного или аутоиммунного заболевания, и, (б) если указанный индивид испытывал приступ, кризис, обострение или вспышку воспалительного или аутоиммунного заболевания, введение указанному индивидууму эффективного количества соединения, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3. В одном воплощении соединение представляет собой антитело, фрагмент антитела, пептид, гликоалкалоид, антисмысловую нуклеиновую кислоту, рибозим, ретиноид, аверим, низкомолекулярное соединение, или любую их комбинацию. В одном воплощении индивидуум имеет воспалительное или аутоиммунное заболевание, опосредованное Т-клетками. Примеры аутоиммунных заболеваний или заболеваний включают такие заболевания как синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), приобретенная атрофия поджелудочной железы, острый передний увеит, острый рассеянный энцефаломиелит, острый подагрический артрит, острый геморрагический некротический лейкоэнцефалит, острый или хронический синусит, острый гнойный менингит (или другие воспалительные заболевания центральной нервной системы), острое тяжелое воспаление, болезнь Аддисона, адреналит, сахарный диабет, развивающийся у взрослых (диабет II типа), идиопатический гипопаратиреоз, развивающийся у взрослых (АОIH), агаммаглобулинемия, агранулоцитоз, васкулиты (включая васкулит больших сосудов (в том числе ревматическая полимиалгия и артрит гигантских клеток (артрит Такаясу)), аллергические состояния, аллергический контактный дерматит, аллергический дерматит, аллергический гранулематозный васкулит, аллергическая гиперчувствительность, аллергический неврит, аллергические реакции, гнездная алопеция, тотальная алопеция, синдром Альпорта, альвеолит (например, аллергический альвеолит и фиброзирующий альвеолит), болезнь Альцгеймера, амилоидоз, амилотрофический боковой склероз (АБС, болезнь Лу Геринга), заболевания, связанные с эозинофилами (например, эозинофилия), анафилаксия, болезнь Бехтерева, ангиэктазия, антитело-опосредованный нефрит, анти-GBM/анти-TBM нефрит, комплекс антиген-антитело-опосредованные заболевания, синдром Гудпасчера, синдром антифосфолипидных антител, антифосфолипидный синдром (АФС), афты, афтозный стоматит, апластическая анемия, аритмия, атеросклероз, ате-

росклеротические заболевания, артрит (например, ревматоидный артрит, такой как острый артрит, хронический ревматоидный артрит), хронический прогрессирующий артрит, деформирующий артрит, аскаридоз, аспергиллома (или гранулемы, содержащие эозинофилы), аспергиллез, аспермиогенез, астма (например, бронхиальная астма, а также аутоиммунная астма), атаксия-телеангиэктазия, атаксический склероз, атеросклероз, аутизм, аутоиммунный ангионевротический отек, аутоиммунная апластическая анемия, аутоиммунный атрофический гастрит, аутоиммунный диабет, аутоиммунное заболевание яичек и яичников, включая аутоиммунный орхит и оофорит, аутоиммунные заболевания синтеза коллагена, аутоиммунная вегетативная дистония, аутоиммунные заболевания уха (например, аутоиммунные заболевания внутреннего уха (AGED)), аутоиммунные эндокринные заболевания, включая тиреоидит, такой как аутоиммунный тиреоидит, аутоиммунная энтеропатия, аутоиммунная дисфункция половых желез, аутоиммунная потеря слуха, аутоиммунный гемолиз, аутоиммунный гепатит, аутоиммунные заболевания печени, аутоиммунная гиперлипидемия, аутоиммунный иммунодефицит, аутоиммунные заболевания внутреннего уха (AIED), аутоиммунный миокардит, аутоиммунная нейтропения, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунная полиэндокринопатия, аутоиммунный полигландулярный синдром I типа, аутоиммунная ретинопатия, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура (АТП), аутоиммунные заболевания щитовидной железы, аутоиммунная крапивница, аутоиммунно-опосредованные заболевания желудочно-кишечного тракта, аксональные и нейрональные невропатии, болезнь Бало, болезнь Бехчета, семейное доброкачественное, ишемически-реперфузионное повреждение, доброкачественный лимфоцитарный васкулит, болезнь Бергера (IgA нефропатия), экзогенный аллергический альвеолит, слепота, болезнь Бека, облитерирующий бронхиолит (без пересадки) при NSIP (неспецифическая интерстициальная пневмония), бронхит, бронхо-пневматический аспергиллез, синдром Брутона, буллезный пемфигоид, синдром Каплана, кардиомиопатия, сердечнососудистая ишемия, синдром Кастельмана, глютеновая болезнь, целиакия, спру целиакия (глютеновая энтеропатия), дегенерация мозжечка, церебральная ишемия, заболевания, сопровождающиеся васкуляризацией, болезнь Шагаса, каналопатии (например, эпилепсия), каналопатии ЦНС, хориоретинит, хориоидит, аутоиммунные гематологические заболевания, хронический активный гепатит и аутоиммунный хронический активный гепатит, хронический контактный дерматит, хроническая эозинофильная пневмония, синдром хронической усталости, хронический гепатит, хронический аллергический пневмонит, хронический воспалительный артрит, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), хроническое стойкое воспаление, хронический кожно-слизистый кандидоз, хронические невропатии (например, IgM-полиневропатия или IgM-опосредованная невропатия), хроническая обструктивная болезнь легких, хроническое воспаление легких, хронический рецидивирующий мультифокальный остомиелит (CRMO), хронический тиреоидит (тиреоидит Хашимото) или подострый тиреоидит, синдром Черджа-Стросса, рубцовый пемфигоид/доброкачественный пемфигоид слизистой оболочки, воспалительные заболевания центральной нервной системы, васкулит ЦНС, целиакия, синдром Когана, синдром холодовой агглютинации, полипозный колит, колиты, такие как язвенный колит, коллагеновый колит, сопровождающиеся инфильтрацией Т-клеток и хронические воспалительные реакции, врожденный порок сердца, врожденная краснуха, анемия с положительной пробой Кумбса, заболевания коронарных артерий, миокардит Коксаки, CREST синдром (кальциноз, синдром Рейно), болезнь Крона, криоглобулинемия, синдром Кушинга, циклит (например, хронический циклит, гетерохронный циклит, иридоциклит или циклит Фукса), муковисцидоз, цитокин-индуцированная токсичность, глухота, дегенеративный артрит, демиелинизирующие заболевания (например, аутоиммунные демиелинизирующие заболевания), демиелинизирующие невропатии, лихорадка денге, герпетиформный дерматит и атопический дерматит, в том числе контактный дерматит, дерматомиозит, дерматозы с острым воспалением, болезнь Девика (нейромиелит зрительного нерва), заболевания крупных артерий, вызванные диабетом, диабетическая нефропатия, диабетическая ретинопатия, синдром Даймонда-Блэкфена, диффузный интерстициальный легочный фиброз, дилатационная кардиомиопатия, дискоидная красная волчанка, заболевания, сопровождаемые диапедезом лейкоцитов, синдром Дресслера, контрактуры Дюпюитрена, инфекции эховирусом, экзема, в том числе сопровождаемая аллергическим или атопическим дерматитом, энцефалит, такой как энцефалит Расмуссена и энцефалит лимбической системы и/или ствола мозга, энцефаломиелит (например, аллергический энцефаломиелит или экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ)), внутриартериальная гиперплазия, эндокардит, эндокринная офтальмопатия, эндометриоз, эндомиокардиальный фиброз, факоанафилактический эндофтальмит, эндофтальмит, энтерит, аллергический синдром эозинофилии-миалгии, эозинофильный фасциит, эпидемический кератоконьюктивит, приобретенный буллезный эпидермолиз (ПБЭ), эписклера, эписклеритом, вирусная инфекция Эпштейна-Барр, стойкая возвышающаяся эритема, мультиформная эритема, узловатая лепрозная эритема, узловатая эритема, эритробластоз пищевода зародыша, заболевания эзофагеальной моторики, криоглобулинемия смешанного типа, этмоидит, синдром Эванса, экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ), дефицит фактора VIII, "легкое фермера" или экзогенный аллергический альвелиолит, ревматическая лихорадка, синдром Фелти, фибромиалгия, фиброзирующий альвеолит, флариаз, фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), пищевые отравления, атрофия желудка, гигантоклеточный артериит (темпоральный артериит), гигантоклеточный гепатит, гигантоклеточная полимиалгия, гломерулонефритиды, гломерулонефрит (ГН) с нефротическим синдромом и без него, такой

как хронический или острый гломерулонефрит (например, первичный ГН), синдром Гудпасчера, подагрический артрит, синдромы, связанные с переливанием гранулоцитов, гранулематоз, включая лимфоматоидный гранулематоз, гранулематоз с полиангиитом (GPA), гранулематозный увеит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, каплевидный псориаз, пароксизмальная гемоглобинурия, болезнь Хаммена-Рича, болезнь Хашимото, энцефалит Хашимото, тиреоидит Хашимото, гемохроматоз, гемолитическая анемия или иммунная гемолитическая анемия, в том числе аутоиммунная гемолитическая анемия (AIHA), гемолитическая анемия, гемофилия, пурпура Шенлейна-Геноха, герпес беременных, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), гипералгезии, гипогаммаглобулинемия, гипогонадизм, гипопаратиреоз, идиопатический несахарный диабет, идиопатический паралич лицевого нерва, идиопатический гипотиреоз, идиопатическая IgA нефропатия, идиопатический мембранный ГН или идиопатическая мембранная нефропатия, идиопатический нефротический синдром, идиопатический легочный фиброз, идиопатическая спру, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP), IgA нефропатия, IgE-опосредованные заболевания (например, анафилаксии, аллергический и атопический ринит), IgG4-связанные склеротические заболевания, регионарный илеит, иммунокомплексный нефрит, иммунные ответы, связанные с острой и отсроченной гиперчувствительностью, опосредованные цитокинами и Т-лимфоцитами, иммунный ГН, заболевания, связанные с иммунорегуляторными липопротеинами, в том числе острый респираторный дистресс-синдром или респираторный дистресс-синдром взрослых (ARDS), миозит с тельцами включения, инфекционный артрит, бесплодие из-за анти-сперматозоидных антител, воспаление всего или части увеального тракта, воспалительные заболевания кишечника (IBD), воспалительные гиперпролиферативные заболевания кожи, воспалительная миопатия, инсулин-зависимый сахарный диабет (I типа), инсулит, интерстициальный цистит, интерстициальное заболевание легких, интерстициальный фиброз легких, ирит, ишемическое реперфузионное повреждение, воспаление суставов, ювенильный артрит, юношеский дерматомиозит, ювенильный диабет, юношеский сахарный диабет (I типа), включая инсулин-зависимый сахарный диабет у детей (IDDM), ювенильный ревматоидный артрит, синдром Кавасаки, сухой кератоконьюктивит, трипаносомоз, синдром Ламберта-Итона, лейшманиоз, проказа, лейкопения, недостаточность адгезии лейкоцитов, лейкоцитокластический васкулит, лейкопения, красный плоский лишай, склероатрофический лишай, кератоконьюктивит, линейный IgA дерматоз, линейные IgA заболевания (LAD), синдром Леффлера, волчаночный гепатит, волчанка (в том числе нефрит, энцефалит, педиатрическая, непочечная, внепочечная, дискоидная, алопеция), волчанка (СКВ), диссеминированная красная волчанка, артрит Лайма, болезнь Лайма, лимфоидная интерстициальная пневмония, малярия, мужское и женское аутоиммунное бесплодие, васкулит верхнечелюстной артерии, васкулит средних сосудов (в том числе болезнь Кавасаки и узелковый полиартрит), мембранный или мембранный пролиферативный ГН (MPGN), в том числе I типа и II типа, быстро прогрессирующий ГН, мембранный ГН (мембранные нефропатии), болезнь Меньера, менингит, микроскопический колит, микроскопический полиангиит, мигрень, нефропатия с минимальными изменениями, смешанные заболевания соединительной ткани (MCTD), инфекционный мононуклеоз, язва Морена, болезнь Муха-Габермана, мультифокальная моторная нейропатия, эндокринная множественная недостаточность, синдром множественного повреждения органов вследствие сепсиса, травмы или кровотечения, синдром множественного повреждения органов, рассеянный склероз (РС), такой, как спинно-оптический РС, эпидемический паротит, мышечные заболевания, миастения гравис, например, ассоциированная с тимомой миастения гравис, миокардит, миозит, нарколепсия, некротизирующий энтероколит и трансмуральный колит, аутоиммунные воспалительные заболевания кишечника, некротизирующий, кожный или аллергический васкулит, неонатальный волчаночный синдром (НВС), нефроз, нефротический синдром, неврологические заболевания, нейромиелит зрительного нерва (Девика), нейромиелит зрительного нерва, нейромиотония, нейтропения, доброкачественный лимфоцитоз, негранулематозный увеит, доброкачественные тимомы, глазные и орбитальные воспалительные заболевания, глазной рубцовый пемфигоид, оофорит, симпатическая офтальмия, опсоклонус миоклонус синдром (OMS) опсоклонус или опсоклонус миоклонус синдром (OMS), сенсорная невропатия, неврит зрительного нерва, гранулематозный орхит, остеоартроз, палиндромный ревматизм, панкреатит, панцитопения, PANDAS (детское аутоиммунное психоневрологическое заболевание, ассоциированное со стрептококком), паранеопластическая дегенерация мозжечка, паранеопластический синдром, паранеопластические синдромы, в том числе неврологические паранеопластические синдромы (например, миастенический синдром Ламберта-Итона или синдром Ламберта-Итона), паразитарные заболевания, такие как лейшманиоз, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), синдром Паррi-Ромберга, парспланит (периферический увеит), синдрома Персонейджа-Тернера, парвовирусные инфекции, пемфигоид, такой как буллезный и кожный пемфигоид, пузырчатка (в том числе обыкновенная пузырчатка), волчанковая пузырчатка, листовидная пузырчатка, пемфигоид слизистых, пузырчатка, язвенная болезнь, периодический паралич, периферическая невропатия, перивенозной энцефаломиелит, злокачественная анемия (перниционная анемия), злокачественная анемия, факоантигенный увеит, цирроз легкого, синдром Кроу-Фуказа (POEMS), узелковый полиартрит, первичный хронический полиартрит I, II и III типа, полихондрит (например, устойчивый или рецидивирующий полихондрит), полиэндокринное аутоиммунное заболевание, полиэндокринная недостаточность, полигландулярный синдром (например, аутоиммунный полигландулярный синдром (или полигландулярный эндокринопатический синдром)),

ревматическая полимиалгия, полимиозит, полимиозит/дерматомиозит, полинейропатия, острый полирадикулоневрит, посткардиотомный синдром, задний увеит или аутоиммунный увеит, постинфарктный синдром, посткардиотомный синдром, постстрептококковый нефрит, поствакцинальный синдром, пресенильное слабоумие, первичный билиарный цирроз, первичный гипотиреоз, первичная идиопатическая микседема, первичный лимфоцитоз, включающий моноклональный В-клеточный лимфоцитоз (например, доброкачественную моноклональную гаммапатию и моноклональную гаммапатию неопределенного генеза, MGUS), первичная микседема, первичный прогрессирующий РС, первичный прогрессирующий РС (PPMS) и возвратно-ремиттирующий РС (RRMS), первичный склерозирующий холангит, прогестероновый дерматит, прогрессирующий системный склероз, пролиферативный артрит, псориаз, такой как пятнистый псориаз, псориаз, псориатический артрит, легочно-альвеолярный протеиноз, эозинофильный инфильтрат легкого, истинная эритроцитарная анемия или аплазия (PRCA), гнойный или безгнойный синусит, пустулезный псориаз и псориаз ногтей, пиелит, гангренозная пиодермия, тиреоидит Кервена, феномен Рейно, реактивный артрит, привычный выкидыш, снижение артериального давления, рефлекторная симпатическая дистрофия, устойчивое спру, болезнь или синдром Рейтера, рецидивирующий полихондрит, реперфузионное повреждение миокарда или других тканей, реперфузия травмы, респираторный дистресс-синдром, синдром беспокойных ног, аутоиммунные заболевания сетчатки, забрюшинный фиброз, синдром Рейно, ревматические заболевания, ревматизм, ревматическая лихорадка, ревматоидный артрит, ревматоидный спондилит, инфекция вирусом краснухи, синдром Сэмптера, саркоидоз, шистосомоз, синдром Шмидта, SCID и связанные с вирусом Эпштейн-Барр заболевания, заболевания склеры, склерит, склеродактилия, склеродермия (включая системную склеродермию), склерозирующий холангит, диссеминированный склероз, склероз, такой как системный склероз, сенсоневральная потеря слуха, серонегативные спондилоартриты, синдром Шихана, синдром Шульмана, силикоз, синдром Шегрена, аутоиммунность к сперме и яичкам, клиновидный синусит, синдром Стивенса-Джонсона, синдром мышечной скованности, подострый бактериальный эндокардит (SBE), подострая кожная красная волчанка, внезапная потеря слуха, синдром Сусака, хорея Сиденхема, симпатическая офтальмия, системная красная волчанка (СКВ) или системная эритематозная волчанка (например, кожная СЭВ), системный некротический васкулит и ANCA-ассоциированный васкулит, такой как васкулит или синдром Черджа-Стросса (CSS), сухотка спинного мозга, артериит Такаясу, телеангиэктазия, височный артериит/гигантоклеточный артериит, облитерирующий тромбангиит, тромбоцитопения (например, развивающаяся у больных инфарктом миокарда), в том числе тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP) и аутоиммунная или иммунная тромбоцитопения, такая как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP), включая хроническую или острую ITP, тромбоцитопеническая пурпура (TP), тиреотоксикоз, повреждение тканей, синдром Толоса-Ханта, токсический эпидермальный некролиз, синдром токсического шока, реакции на переливание, транзиторная гипогаммаглобулинемия новорождённых, поперечный миелит, поперечный миелит, тропическая легочная эозинофилия, туберкулез, язвенный колит, недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), крапивница (например, хроническая аллергическая крапивница и хроническая идиопатическая крапивница, в том числе хроническая аутоиммунная крапивница), увеит (например, передний увеит), увеоретинит, вальвулит, сосудистая дисфункция, васкулит, позвоночный артрит, везикуло-буллезный дерматоз, витилиго, гранулематоз Вегенера (в настоящее время известен как гранулематоз с полиангиитом (GPA), синдром Вискотта-Олдрича, и сцепленный с Х-хромосомой гипер IgM синдром, но не ограничиваются ими.

В одном воплощении примером воспалительного заболевания может быть ревматическое заболевание (например, ревматоидный артрит, остеоартрит, псориатический артрит), спондилоартропатии (например, анкилозирующий спондилит, реактивный артрит, синдром Рейтера), кристаллические артропатии (например, подагра, псевдоподагра, болезнь отложения пирофосфата кальция), рассеянный склероз, болезнь Лайма, ревматическая полимиалгия; заболевания соединительной ткани (например, системная красная волчанка, системный склероз, полимиозит, дерматомиозит, синдром Шегрена); васкулиты (например, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, синдром Черджа-Стросса); воспалительные состояния, включая последствия травмы или ишемии, саркоидоз; сосудистые заболевания, включая атеросклеротические сосудистые заболевания, атеросклероз и сосудистые окклюзионные заболевания (например, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, инсульт, болезни периферических сосудов), рестеноз стента сосуда; глазные болезни, включая увеит, заболевания роговицы, ирит, иридоциклит, катаракта, кислотный рефлюкс/изжога, акне, вульгарные угри, аллергии и гиперчувствительности, болезнь Альцгеймера, астма, атеросклероз и сосудистый облитерирующий эндартериит (например, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, инсульт, болезнь периферических сосудов) и рестеноз стента сосуда, аутоиммунные заболевания, бронхит, рак, кардит, катаракта, целиакия, хронические боли, хронический простатит, цирроз, колит, болезни соединительной ткани (например, системная красная волчанка, системная склеродермия, полимиозит, дерматомиозит, синдром Шегрена), заболевания роговицы, болезнь Крона, кристаллические артропатии (например, подагра, псевдоподагра, болезнь отложения пирофосфата кальция), деменция, дерматит, диабет, сухость глаза, экзема, отек, эмфизема, фибромиалгии, гастроэнтерит, гингивит, гломерулонефрит, болезнь сердца, гепатит, высокое кровяное давление, гиперчувствительность, воспалительные заболевания кишечника, воспалитель-

ные состояния, включая последствия травмы или ишемии, инсулинорезистентность, интерстициальный цистит, иридоциклит, ирит, боли в суставах/артрит/ревматоидный артрит, болезнь Лайма, метаболический синдром (синдром X), рассеянный склероз, миозит, нефрит, ожирение, заболевания глаз, в том числе увеит, остеопения, остеопороз, болезнь Паркинсона, воспалительные заболевания таза, пародонтоз, полиартрит, полихондрит, ревматическая полимиалгия, псориаз, реперфузионное повреждение, ревматический артрит, ревматические заболевания (например, ревматоидный артрит, остеоартрит, псориатический артрит), ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермия, синусит, синдром Шегрена, синдром раздраженной толстой кишки, спондилоартропатии (например, болезнь Бехтерева, реактивный артрит, синдром Рейтера), системный кандидоз, тендинит, отторжение трансплантата, инфекции мочевых путей, вагинит, сосудистые заболевания, включая атеросклеротические сосудистые заболевания, васкулиты (например, узелковый полиартрит, гранулематоз Вегенера, синдром Черджа-Стросса) и васкулит.

В одном воплощении изобретения, вводимое индивидууму соединение может представлять собой анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела. В одном воплощении антитело может быть химерным, гуманизированным, антиидиотипическим, одноцепочечным, бифункциональным или ко-специфическим.

В одном воплощении легкая цепь указанного антитела может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 3 или 5. В одном воплощении остатки 3, 4, 9, 24, 32, 41, 47, 50, 55, 71 и 74 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 являются Q, L, S, R, A, G, L, D, E, F и A соответственно. В другом воплощении аминокислотные остатки 3, 4, 9, 24, 32,41, 47, 50, 55, 71 и 74 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 представляют собой R, M, F, W, Y, A, F, Y, Q, Y и T соответственно. В одном воплощении тяжелая цепь указанного антитела может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 4 или 6. В другом воплощении антитело может содержать аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи, соответствующую остаткам 24-34 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1; аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи, соответствующую остаткам 50-56 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1; аминокислотную последовательности CDR3 легкой цепи, соответствующую остаткам 89-97 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. В другом воплощении антитело может содержать аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи, соответствующую остаткам 24-34 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3; аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи, соответствующую остаткам 50-56 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3; аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи, соответствующую остаткам 89-97 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

В одном воплощении антитело может содержать аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи, соответствующую остаткам 31-35 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи, соответствующую остаткам 50-65 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи, соответствующую остаткам 99-112 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В другом воплощении антитело может содержать аминокислотную последовательность тяжелой цепи CDR, соответствующую остаткам 31-35 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи, соответствующую остаткам 50-66 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи или 4, соответствующую остаткам 99-113 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

В одном воплощении антитело может содержать вариабельную последовательность легкой цепи и вариабельную последовательность тяжелой цепи, содержащие последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно. В одном воплощении антитело может содержать вариабельную последовательность легкой цепи и вариабельную последовательность тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно. В одном воплощении антитело может содержать вариабельную последовательность легкой цепи и вариабельную последовательность тяжелой цепи, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно. В одном воплощении антитело связывается с эпитопом в пределах аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24. В другом воплощении антитело может связывать KIR2DL1 в пределах области, определяемой по меньшей мере одним из аминокислотных остатков, принадлежащих к следующей группе: 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 воплощении антитело может связывать KIR2DL1 и KIR2DL2/3 в области, определяемой по меньшей мере одним из аминокислотных остатков, принадлежащих к следующей группе: 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 одном воплощении антитело или его фрагмент может быть напрямую или не напрямую конъюгирован с меткой, цитотоксическим агентом, терапевтическим агентом или иммунодепрессантом. В другом воплощении метка может быть хемилюминесцентной меткой, парамагнитной меткой, контрастирующим агентом для МРТ, флуоресцентной меткой, биолюминесцентной меткой или радиоактивной меткой. В одном воплощении парамагнитная метка может содержать атом алюминия, марганца, платины, кислорода, лантана, лютеция, скандия, иттрия или галлия. В одном воплощении цитотоксический агент может

быть фрагментом, который ингибирует синтез ДНК, РНК или белка, радионуклидом, или белком, ингибирующим рибосомальный синтез белка. В одном воплощении цитотоксическим агентом может быть ^{212}Bi, $^{13'}$I, ^{188}Re, ^{90}Y, виндезин, метотрексат, адриамицин, цисплатин, противовирусный белок лаконоса, экзотоксин А пвсевдомонад, рицин, дифтерийный токсин, А цепь рицина или цитотоксический фермент фосфолипаза.

В одном воплощении антитело блокирует или нейтрализует ингибирование NK-клеток. В одном воплощении антитело связывается по меньшей мере с одним из рецепторов KIR2DL1, 2 или 3 и нейтрализует KIR2DL1, 2 и/или 3-опосредованное ингибирование цитотоксичности NK-клеток. В одном воплощении нейтрализующее антитело может осуществлять по меньшей мере около 20%-ное увеличение специфического лизиса NK-клетками клеток-мишеней NK-клеток.

В одном воплощении антитело конкурирует за связывание с той же антигенной детерминирующей областью с моноклональными антителами 7F9-1, DF200 и/или NKVSF1. В одном воплощении антитело связывается по меньшей мере с двумя ингибирующими рецепторами KIR на поверхности NK-клеток. В другом воплощении антитело связывается с общей антигенной детерминирующей областью рецепторов KIR2DL индивидуума. В другом воплощении антитело связывается с KIR2DL1, 2 и/или 3-рецепторами.

В одном воплощении антитело имеет сродство к KIR2DL1, 2 и/или 3 по меньшей мере от около 10^4 до около 10^{10} M^{-1}. В другом воплощении антитело имеет сродство к KIR2DL1, 2 и/или 3 по меньшей мере от около 10^7 до около10^9 M^{-1}. В одном воплощении антитела демонстрируют связывание KJR с константой диссоциации менее чем около 100 нМ.

В одном воплощении антитело перекрестно реагирует с KIR 2DL1 плюс 2DL2/3, 3DL1 плюс 3DL2, 2DL1 (и 2DL2/3) плюс 2DS4 и 2DL1 (и 2DL2/3), но не 2D24.

В одном воплощении антитело может представлять собой DF200, 1-7F9 или NKVSF1 антитело.

В одном воплощении соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, может быть введено в виде монотерапии. В другом воплощении соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, может быть введено в комбинации со вторым терапевтическим агентом. В одном воплощении вторым терапевтическим агентом может быть агент, который уменьшает воспаление. В другом воплощении вторым терапевтическим агентом может быть низкомолекулярный химический агент. В другом воплощении вторым терапевтическим агентом может быть DMARD, необязательно, анти-ФНО антитело, низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы или метотрексат (MTX). В другом воплощении вторым терапевтическим агентом может быть агент, отличный по природе от антитела, имеющего IgG1 или IgG3 изотип.

В одном воплощении соединение, которое ингибирует полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, может быть анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителом, обладающим способностью блокировать или нейтрализовать KIR2DL1, 2 и/или 3-опосредованное ингибирование NK-клеток и тем самым усиливать активность NK-клеток против блокированных в противном случае клеток-мишеней. В другом воплощении антитело может быть антителом анти-KIR, которое связывает KIR2DL1 и KIR2DL2/3. В другом воплощении антитело анти-KIR конкурирует с 1-7F9 за связывание с KIR2DL1, 2 и/или 3. В другом воплощении антитело может быть 1-7F9 антителом. В другом воплощении антитело может содержать V_L и V_H домены 1-7F9 антитела. В другом воплощении антитело может содержать CDR V_L и V_H от 1-7F9.

В одном воплощении анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела можно вводить в виде фармацевтически приемлемой композиции, которая может содержать эффективное количество анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител. В другом воплощении композиция может быть свободна от любых других фармацевтически активных агентов.

В одном воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела можно вводить в количестве, в результате введения которого достигается полное насыщение KIR2DL1, 2 и/или 3 на NK-клетках в течение периода по меньшей мере около 1 недели. В другом воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела можно вводить в количестве, в результате введения которого достигается полное насыщение KIR2DL1, 2 и/или 3 на NK-клетках в течение по меньшей мере около 2 недель. В другом воплощении анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела можно вводить в количестве, в результате введения которого достигается полное насыщения KIR2DL1, 2 и/или 3 на NK-клетках в течение по меньшей мере около 1 месяца. В другом воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела можно вводить несколько раз с частотой дозирования около одного раза в каждые 2 недели. В другом воплощении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела можно вводить несколько раз с частотой дозирования один раз в каждом месяце. В другом воплощении анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела можно вводить несколько раз с частотой дозирования около 1 раз каждые 2 месяца или 1 раз в течение более чем 2 месяцев.

Кроме того, изобретение относится к применению композиции для лечения аутоиммунного заболевания, которая может содержать анти-KIR2DL1 антитела. В другом воплощении композиция, используемая для лечения аутоиммунного заболевания, может содержать анти-KIR2DL2 антитела. В другом воплощении композиция для применения для лечения аутоиммунного заболевания может содержать анти-KIR2DL3 антитела. В другом воплощении композиция для применения для лечения воспалительного заболевания может содержать анти-KIR2DL1 антитела. В другом воплощении композиция для применения для лечения воспалительного заболевания может содержать анти-KIR2DL2 антитела. В другом во-

площении композиция для применения для лечения воспалительного заболевания может содержать анти-KIR2DL3 антитела.

В одном воплощении настоящее изобретение предусматривает применение анти-KIR2DL1 антитела для изготовления лекарственного средства для лечения аутоиммунного заболевания. В другом воплощении настоящее изобретение относится к применению анти-KIR2DL2 антитела для изготовления лекарственного средства для лечения аутоиммунного заболевания. В другом воплощении настоящее изобретение относится к применению анти-KIR2DL3 антитела для изготовления лекарственного средства для лечения аутоиммунного заболевания. В другом воплощении настоящее изобретение относится к применению анти-KIR2DL1 антитела для изготовления лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания. В другом воплощении настоящее изобретение относится к применению анти-KIR2DL2 антитела для изготовления лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания. В другом воплощении настоящее изобретение относится к применению анти-KIR2DL3 антитела для изготовления лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания.

В одном воплощении настоящее изобретение относится к способу получения антител для лечения воспалительного или аутоиммунного заболевания, причем указанный способ может включать следующие стадии: (а) иммунизация млекопитающего, отличного от человека, иммуногеном, который может содержать полипептид KIR2DL1, 2 и/или 3, (б) отбор антител у указанного иммунизированного млекопитающего, где указанный тип антитела связывается с указанными полипептидами KIR2DL1, 2 и/или 3, и (с) отбоа антител (б), потенцирующих устранение Т-клеток NK-клетками.

В одном воплощении настоящее изобретение относится к способу получения антитела для лечения воспалительного или аутоиммунного заболевания, который может включать получение библиотеки антител с помощью метода фагового дисплея, в котором указанные антитела связываются с полипептидами KIR2DL1, 2 и/или 3, и отбор антител, которые потенцируют устранение или сокращение численности Т-клеток NK-клетками.

Эти аспекты, а также дополнительные аспекты, признаки и преимущества настоящего изобретения, которые будут очевидны из описания изобретения, будут более подробно описаны в данном документе.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1А отражает снижение процента CSFE-меченых клеток (Con A бласты) в PBMC от KIR2DL3tg B6 мышей после введения антител 1-7F9 по сравнению с необработанными KIR2DL3tg B6 мышами и C57Bl6 мышами с введением 1-7F9 или без такого введения.

На фиг. 1В отражено снижение процента CSFE-меченых клеток селезенки у KIR2DL3tg B6 мышей после введения антител 1-7F9 по сравнению с необработанными KIR2DL3tg B6 мышами и C57Bl6 мышами с введением 1-7F9 или без такого введения.

На фиг. 2 представлено снижение выживаемости KbDb-/-cw3 ConA бластов в PBMC и клетках селезенки у KIR2DL3tg B6 мышей при лечениях антителами 1-7F9 по сравнению с необработанными 1-F9 мышами KbDb KOcw3tg.

Подробное описание изобретения

Последующее подробное описание изобретения изложено здесь для более полного понимания описываемого изобретения. Различные варианты осуществления настоящего изобретения будут подробно описаны и могут быть дополнительно проиллюстрированы примерами.

Термины

Все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, как они обычно понимаются средним специалистом в той области техники, к которой относится настоящее изобретение, если они не определены иначе.

Подходящие способы и материалы описаны здесь, но другие способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь, могут использоваться в настоящем изобретении или для тестирования настоящего изобретения. Материалы, способы и примеры, приведенные здесь, являются только иллюстративными, но не ограничивающими.

В описании и формуле настоящего изобретения упоминание понятий в единственном числе также охватывает их указание во множественном числе, если прямо не указано иное.

Термин "антигенпрезентирующие клетки", используемый здесь, относится в широком смысле к специализированным антигенпрезентирующим клеткам (например, В-лимфоцитам, моноцитам, дендритным клеткам и клеткам Лангерганса), а также другим антигенпрезентирующим клеткам (например, кератиноцитам, эндотелиальным клеткам, астроцитам, фибробластам и олигодендроцитам).

Термин "аминокислота", используемый здесь, относится в широком смысле к природным и синтетическим аминокислотам, а также аминокислотным аналогам и миметикам (заменителям) аминокислот, которые функционируют аналогично природным аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые затем могут быть модифицированы (например, гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат и О-фосфосерин) К аналогам аминокислот относятся соединения, которые имеют такую же основную химическую структуру, как и природные аминокислоты (т.е. углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой), и R-группу (например, группу гомосерина, норлейцина, метионин-

сульфоксида, метионинметилсульфония). Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют ту же основную химическую структуру, как природные аминокислоты. Миметики (заменители) аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислот, которые функционируют аналогично природным аминокислотам.

Термин "анергия" или "толерантность" в настоящем документе относится в широком смысле к рефрактерности активирующей рецептор-опосредованной стимуляции. Такая рефрактерность, как правило, является антигенспецифической и сохраняется после того, как воздействие подавляющего антигена на рецептор исчезает.

Термин "антитело", используемый здесь, относится в широком смысле к "антигенсвязывающему участку" антитела (также этот термин может взаимозаменяемо быть использован с термином "часть антитела", "антигенсвязывающий фрагмент", "фрагмент антитела"), а также полноразмерным молекулам антител. Термин "антигенсвязывающий фрагмент", используемый здесь, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, KIR2DL1, 2 и/или 3). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена фрагментами полноразмерного антитела. Примерами антигенсвязывающих фрагментов антител, охватываемых термином "антигенсвязывающая часть", могут быть (а) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L, V_H, CL и CH1; (б) $F(ab')_2$-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (в) Fd-фрагмент, состоящий из доменов V_H и CH1, (г) Fv-фрагмент, состоящий из V_L и V_H доменов одного плеча антитела; (д) dAB фрагмент (Ward и др. (1989),. Nature, 341:544- 546.), который состоит из домена V_H; и (е) изолированный определяющий комплементарность район (CDR). Кроме того, несмотря на то, что два домена фрагмента Fv, V_L и V_H, кодируются отдельными генами, их можно объединить, используя рекомбинантные методы, с помощью синтетического линкера, который позволяет им синтезироваться в виде одной белковой цепи, в которой V_L и V_H области попарно объединяются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv) фрагмент; см., например, Bird, et al. (1988), Science, 242:423-426; Huston, et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883; и Osbourn, et al. (1998), Nat. Biotechnol. 16:778. Такие одноцепочечные антитела также могут быть включены в термин "антигенсвязывающая часть" антитела. Любые V_H и V_L последовательности конкретного scFv могут быть связаны с константной иммуноглобулиновой областью из кДНК индивидуума или геномными последовательностями в целях получения экспрессирующих векторов, кодирующих полноразмерные молекулы IgG или других изотипов. V_H и V_L можно также использовать для получения Fab, Fv или других фрагментов иммуноглобулинов с использованием белковой химии или методов рекомбинации ДНК. Другие формы одноцепочечных антител, таких как диантела, также охватываются этим термином. "Диатела" представляют собой двухвалентные, биспецифические антитела, в которых V_H и V_L домены экспрессированы в виде одной полипептидной цепи с использованием линкера, который слишком короток, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами одной и той же цепи, тем самым вынуждая домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих участка. См. например Holliger, et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448; Poljak, et al. (1994), Structure, 2:1121-1123.

Более того, антитело или его антигенсвязывающая часть (антигенсвязывающий фрагмент, фрагмент антитела, часть антитела) могут быть частью более крупных молекул иммуноадгезии, образованных ковалентной или нековалентной ассоциацией антитела или части антитела с одним или более другими белками или пептидами. Примерами таких молекул иммуноадгезии являются использование центральной части стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv Kipriyanov, et al. (1995), Hum. Antibodies Hybridomas, 6:93-101) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и С-концевой полигистидиновой метки для получения бивалентных и биотинилированных молекул scFv. Kipriyanov, et al. (1994), Mol. Immunol. 31:1047-1058. Части антител, такие как Fab и $F(ab')_2$-фрагменты, могут быть получены из целых антител с использованием обычных методов, таких как обработка папаином или пепсином соответственно целых антител. Кроме того, антитела, части антитела и молекулы иммуноадгезии могут быть получены с использованием стандартных методик рекомбинации ДНК, как описано здесь.

Антитела могут быть поликлональными, моноклональными, ксеногенными, аллогенными, сингенными или модифицированными, например гуманизированными химерными антителами. Предпочтительно, чтобы антитела, описанные в изобретении, специфически связывались с полипептидами KIR2DL1, 2 и/или 3 или одним из них. Термины "моноклональные антитела" и "композиция моноклональных антител", используемые в данном описании, относятся к группе молекул антител, которые содержат только один вид антигенсвязывающего сайта, способный к иммунореакции с конкретным эпитопом антигена, тогда как термин "поликлональные антитела" и "композиция поликлональных антител" относится к группе молекул антител, которые содержат несколько видов антигенсвязывающих участков, способных взаимодействовать с конкретным антигеном. Композиция моноклональных антитело, как правило, имеет одинаковую аффинность связывания с конкретным антигеном, с которым он реагирует.

Термин "антиген" в настоящем документе относится в широком смысле к молекуле или части мо-

лекулы, способной связываться с антителом, и который также способен индуцировать у животного продукцию антител, способных связываться с эпитопом этого антигена. Антиген может иметь один эпитоп или иметь более одного эпитопа. Специфической реакцией здесь называется то, что антиген будет реагировать с высокой селективностью с соответствующим ему антителом, а не с множеством других антител, продукция которых может быть индуцирована другими антигенами. Примерами желаемого усиления иммунного ответа на конкретные антигены, представляющие интерес, являются антигены инфекционных заболеваний, которые вызываю защитный иммунный ответ, но могут быть и другие примеры.

Термин "антисмысловые молекулы нуклеиновых кислот" в настоящем документе относится в широком смысле к нуклеотидной последовательности, которая комплементарна "смысловой" нуклеиновой кислоте, кодирующей белок (например, комплементарна к кодирующей цепи двухцепочечной молекулы кДНК), или последовательности мРНК, или кодирующей цепи гена. Соответственно, антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты может образовывать водородные связи с некоторыми смысловыми молекулами нуклеиновых кислот.

Термин "апоптоз" в настоящем документе относится в широком смысле к запрограммированной гибели клеток, которая может быть охарактеризована с использованием методов, которые описаны для данной области техники. Гибель клеток путем апоптоза можно охарактеризовать сжиманием клеток, мембранным блеббингом и конденсацией хроматина, а также кульминационной фрагментацией клеток. Клеточный апоптоз также отражается в характерных паттернах расщепления ДНК между нуклеосомами.

Термин "автоиммунизация" или "аутоиммунное заболевание или состояние" в настоящем документе относится в широком смысле к болезни или заболеванию, возникающему из-за собственных тканей индивидуума, и направленному против собственных тканей индивидуума, или связанным с ними заболеваниям, или их проявлению или возникшим вследствие этого состояниям.

Термин "химерное антитело", используемый здесь, относится в широком смысле к молекуле антитела, у которого константная область или ее часть изменены, заменены или обменены таким образом, что сайт связывания антигена (вариабельный район) связан с константной областью антитела другого или измененного класса, с измененной эффекторной функцией и/или другого вида, или совершенно другой молекулой, которая придает новые свойства химерным антителам, например ферментом, токсином, гормоном, фактором роста, лекарственным средством, вариабельный район или его часть изменены, заменены или обменены с вариабельным районом антитела, имеющим другую или измененную антигенную специфичность.

Под термином "кодирующий район" в настоящем документе понимают в широком смысле районы нуклеотидных последовательностей, содержащие кодоны, транслируемые в аминокислотные остатки, тогда как под термином "некодирующий район" понимают районы нуклеотидной последовательности, которые не транслируются в аминокислоты (например, 5'- и 3'-нетранслируемые районы).

Термин "консервативно модифицированные варианты" в настоящем документе употребляют и в отношении аминокислотных последовательностей, и в отношении последовательностей нуклеиновых кислот, и в отношении конкретных последовательностей нуклеиновых кислот, под данным термином понимают нуклеиновые кислоты, кодирующие идентичные или по существу идентичные последовательности или в случае, где нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, - по существу идентичные нуклеотидные последовательности. Вследствие вырожденности генетического кода большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодируют один заданный белок. Такие варианты нуклеиновых кислот являются "молчащими вариантами", которые относятся к одной из разновидностей консервативно модифицированных вариантов. В настоящем документе каждая нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, также характеризует собой любой возможный молчащий вариант данной нуклеиновой кислоты. Специалист в данной области сможет определить, что каждый кодон нуклеиновой кислоты (кроме AUG, который обычно является единственным для метионина, и TGG, который обычно является единственным для триптофана) может быть видоизменён для получения функционально идентичной молекулы.

Под терминами "определяющий комплементарность район", "гипервариабельный район" или "CDR" в настоящем документе понимают в широком смысле один или более гипервариабельный район или район, определяющий комплементарность (CDR), находящийся в вариабельных районах лёгких или тяжёлых цепей антитела. См. Kabat, et al. (1987), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, MD. Данные понятия включают гипервариабельные районы по определению в соответствии с Kabat, et al. (1983), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept, of Health and Human Services или гипервариабельные петли в трёхмерной структуре антител. Chothia and Lesk (1987), J. Mol. Biol. 196:901-917. Структурные районы CDR в каждой цепи находятся в непосредственной близости друг от друга и участвуют в формировании сайта связывания с антигеном совместно с CDR другой цепи. В составе CDR имеются определённые аминокислоты, которые описаны как районы, определяющие селективность (SDR), представляющие собой особо важные "контактные" аминокислотные остатки, используемые CDR во взаимодействии антиген-антитело. Kashmiri (2005), Methods, 36:25-34.

Под термином "контрольное количество" в настоящем документе понимают в широком смысле маркер в любом количестве или диапазоне по сравнению с тестовым количеством маркера. Например,

контрольное количество маркера может быть количеством маркера у пациента с определённым заболеванием или состоянием или у индивидуума без подобного заболевания или состояния. Контрольное количество может выражаться как абсолютное количество (например, мкг/мл) или относительное количество (например, относительная интенсивность сигналов).

Под термином "диагностический" в настоящем документе понимают в широком смысле идентификацию наличия патологического состояния или его сущности. Диагностические способы различаются по своей чувствительности и специфичности. Чувствительность диагностического анализа - это процентный показатель положительных результатов анализа от больных индивидуумов (процентный показатель от "истинно положительных"). Результаты анализа для больных индивидуумов, не идентифицированных в ходе данного анализа, являются "ложноотрицательными". Отрицательные результаты данного анализа для субъектов, которые не больны, являются "истинно отрицательными". Специфичность диагностического анализа рассчитывается как 1 минус уровень ложноположительных результатов, где "ложноположительные" результаты определяются как доля индивидуумов без данного заболевания с положительными результатами анализа. Тогда как конкретный диагностический способ может не предусматривать окончательной диагностики, вполне достаточно, если данный способ предусматривает возможность положительного показания, способствующего диагностике.

Под термином "диагностирование" в настоящем документе в широком смысле понимают классификацию заболевания или симптома, определение серьёзности заболевания, наблюдение за развитием заболевания, прогнозирование исхода заболевания и/или перспектив выздоровления. Термин "детектирование" также может, необязательно, охватывать любое из вышеупомянутых значений. Диагностика заболевания в соответствии с настоящим изобретением может быть в некоторых вариантах осуществлена в ходе определения уровня полинуклеотида или полипептида настоящего изобретения в биологическом образце, выделенном из субъекта, в котором определяемый уровень может коррелировать с наличием или отсутствием заболевания или предрасположенности к нему. Следует отметить, что понятие "биологический образец, выделенный из субъекта" может относиться к образцу, который не был физически удалён из субъекта.

Под термином "эффективное количество" в настоящем документе понимают в широком смысле такое количество соединения, антитела, антигена или клеток, вводимое пациенту для лечения заболевания, которого достаточно для создания определённого эффекта при лечении данного заболевания. Эффективное количество может быть количеством, эффективным для профилактики. Эффективное количество может быть количеством, эффективным для снижения признаков/симптомов, для предотвращения признаков/симптомов, для снижения серьёзности признаков/симптомов, для устранения признаков/симптомов, для замедления развития признаков/симптомов, для предотвращения развития признаков/симптомов и/или для профилактического эффекта в отношении признаков/симптомов. "Эффективное количество" может варьировать в зависимости от заболевания, его серьёзности и возраста, веса, истории болезни, восприимчивости и предшествующих состояний у пациента, которого предстоит лечить. Термин "эффективное количество" является синонимом термина "терапевтически эффективное количество" для целей настоящего изобретения.

Под термином "внеклеточный домен" в настоящем документе понимают в широком смысле часть белка, которая распространяется за поверхностью клетки.

Под термином "экспрессионный вектор" в настоящем документе понимают в широком смысле любую рекомбинантную экспрессионную систему для экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты настоящего изобретения in vitro или in vivo, конститутивно или индуцибельно, в любой клетке, включая прокариотические, дрожжевые, растительные клетки, клетки грибов, насекомых или млекопитающих. Данный термин включает в себя линейные или кольцевые экспрессионные системы. Данный термин включает в себя экспрессионные системы, которые остаются эписомными или интегрируются в геном клетки-хозяина. Экспрессионные системы могут иметь или не иметь способность к саморепликации, т.е. производить только временную экспрессию в клетке. Данный термин включает в себя полигенные экспрессирующие кластеры, которые содержат только минимальный набор элементов, необходимых для транскрипции рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

Под термином "Fc рецептор" (FcR) в настоящем документе понимают в широком смысле клеточные поверхностные рецепторы для Fc части молекул иммуноглобулина (Ig). Fc рецепторы располагаются на многих клетках, участвующих в иммунных ответах. Среди FcR человека, которые идентифицированы на сегодняшний день, существуют рецепторы, распознающие IgG (определяемые как FcγR), IgE (FcεR1), IgA (FcαR) и полимеризованные IgM/A (FeμαR). Рецепторы FcR обнаружены в следующих типах клеток: FcεRI (тучные клетки), FcεRII (многие лейкоциты), FcαR (нейтрофилы) и FcμαR (железистый эпителий, гепатоциты). Hogg (1988), Immunol. Today, 9:185-86. Хорошо изученные рецепторы FcγR являются центральными в клеточном иммунитете, и они ответственны за стимулирование выброса медиаторов воспалительной реакции и гидролитических ферментов, участвующих в патогенезе аутоиммунного заболевания. Unkeless (1988), Annu. Rev. Immunol. 6:251-87. Рецепторы FcγR обеспечивают крайне важную связь между эффекторными клетками и лимфоцитами, секретирующими Ig, поскольку FcγR макрофа-

га/моноцита, полиморфно-ядерного лейкоцита и натурального киллера (NK-клетки) предоставляют элемент для специфического распознавания мишеней, опосредованного IgG. Лейкоциты человека имеют по меньшей мере три разных рецептора IgG: hFcγRI (обнаружен на моноцитах/макрофагах), hFcγRII (на моноцитах, нейтрофилах, эозинофилах, тромбоцитах, вероятно, B-клетках и на клеточной линии K562) и FcγIII (на NK-клетках, нейтрофилах, эозинофилах и макрофагах).

Что касается T-клеток, передача костимулирующего сигнала в T-клетку включает сигнальный каскад, который не ингибируется циклоспорином A. Дополнительно, костимулирующий сигнал может индуцировать секрецию цитокинов (например, IL-2 и/или IL-10) в T-клетке и/или может предотвратить индукцию толерантности к антигену, индукцию анергии или индукцию клеточной смерти в T-клетке.

Под термином "каркасный район" или "FR" в настоящем документе понимают в широком смысле один или более каркасный район внутри вариабельных районов лёгкой и тяжёлой цепей антитела. См. Kabat, et al. (1987), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, MD. Данные понятия включают районы аминокислотной последовательности, расположенные между CDR, в составе вариабельных районов лёгкой и тяжёлой цепей антитела.

Под термином "гетерологичный" в настоящем документе понимают в широком смысле части нуклеиновых кислот, где термин показывает, что данная нуклеиновая кислота состоит из двух или более подпоследовательностей, которые не наблюдаются в таком же расположении друг к другу в природе. Например, нуклеиновая кислота, которая обычно создаётся путём рекомбинации, имеющая две или более последовательности из неродственных генов, расположенные таким образом, чтобы создать новую функциональную нуклеиновую кислоту (например, промотор из одного источника и кодирующий район из другого источника). Аналогично, гетерологичный белок представляет собой белок, состоящий из двух или более подпоследовательностей, которые не наблюдаются в таком же расположении друг к другу в природе (например, химерный белок).

Под термином "высокая аффинность" в настоящем документе понимают в широком смысле антитело, имеющее KD по меньшей мере 10^{-8} M, более предпочтительно по меньшей мере 10^{-9} M и ещё более предпочтительно по меньшей мере 10^{-10} M для антигена-мишени. Однако "высокая аффинность" связывания может варьировать для других изотипов антитела. Например, "высокая аффинность" связывания для изотипа IgM подразумевает антитело, имеющее KD по меньшей мере 10^{-7} M, более предпочтительно по меньшей мере 10^{-8} M.

Под термином "гомология" в настоящем документе понимают в широком смысле степень идентичности между последовательностью нуклеиновой кислоты и последовательностью нуклеиновой кислоты сравнения или между полипептидной последовательностью и полипептидной последовательностью сравнения. Гомология может быть частичной или полной. Полная гомология указывает на то, что нуклеиновые или аминокислотные последовательности идентичны. Частично гомологичная последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность не идентична нуклеиновой кислоте сравнения или аминокислотной последовательности сравнения. Степень гомологии может быть определена путём сравнения последовательностей. Термин "идентичность последовательностей" может быть взаимозаменяем с термином "гомология".

Под термином "клетка-хозяин" в настоящем документе понимают в широком смысле клетку, в которую введена молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, такая как рекомбинантный экспрессионный вектор. Клетки-хозяева могут быть прокариотическими, такими как E.coli, или эукариотическими, такими как дрожжевые, клетки насекомых (например, SF9), амфибий или млекопитающих, такие как CHO, HeLa, HEK-293, например, культивируемые клетки, эксплантаты и клетки in vivo. Термины "клетки-хозяева" и "рекомбинантные клетки-хозяева" являются взаимозаменяемыми в настоящем документе. Следует понимать, что эти термины подразумевают не только конкретную рассматриваемую клетку, но и потомство или потенциальное потомство такой клетки. Поскольку конкретные модификации могут произойти в последующем потомстве вследствие либо мутации, либо влияний окружающей среды, такое потомство может, фактически, не быть идентичным родительской клетке, но всё равно входит в рамки данного термина, как он использован здесь.

Под термином "гуманизированное антитело" в настоящем документе понимают в широком смысле антитела, произведённые не человеческой клеткой, имеющие вариабельный и константный районы, которые были изменены, чтобы иметь более высокое сходство с антителами, которые могли быть произведены человеческой клеткой, например вставкой в аминокислотную последовательность не человеческого антитела аминокислот, обнаруженных в последовательностях иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Гуманизированные антитела настоящего изобретения могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, внесённые случайным или сайт-направленным мутагенезом in vitro или соматической мутацией in vivo), например, в CDR. Термин "гуманизированное антитело" в настоящем документе также включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии или из других видов млекопитающих, таких как мышь, были слиты с человеческими каркасными последовательностями.

Под термином "гибридизация" в настоящем документе понимают в широком смысле физическое взаимодействие комплементарных (включая частично комплементарные) полинуклеотидных цепей посредством формирования водородных связей между комплементарными нуклеотидами, при том что цепи расположены антипараллельно друг другу.

Под термином "иммуноцит" в настоящем документе понимают в широком смысле клетки, происходящие от гематопоэтических клеток и играющие роль в иммунном ответе. Иммуноциты включают лимфоциты, такие как В-клетки или Т-клетки; натуральные киллеры и миелоидные клетки, такие как моноциты, макрофаги, эозинофилы, тучные клетки, базофилы и гранулоциты.

Под термином "иммунологический анализ" в настоящем документе в широком смысле понимают анализ, в котором используют антитело для специфичного связывания с антигеном. Иммунологический анализ может быть охарактеризован использованием специфических связывающих свойств конкретного антитела для выделения, обнаружения и/или определения количества антигена.

Под термином "иммунный ответ" в настоящем документе понимают в широком смысле опосредованные Т-клетками и/или В-клетками иммунные ответы, которые модулируются костимуляцией Т-клеток. Типичные иммунные ответы включают ответы В-клеток (например, синтез антител), ответы Т-клеток (например, синтез цитокинов и клеточная цитотоксичность) и активацию клеток, реагирующих на цитокины, например макрофагов.

В отношении иммунного ответа термин "негативное модулирование" в настоящем документе включает ослабление одного или более иммунных ответов, тогда как термин "позитивное модулирование" в настоящем документе включает усиление одного или более иммунного ответа. Следует понимать, что позитивное модулирование одного типа иммунного ответа может вести к соответствующему негативному модулированию другого типа иммунного ответа. Например, позитивное модулирование синтеза конкретных цитокинов (например, IL-10) может вести к негативному модулированию клеточных иммунных ответов.

Под терминами "воспалительное состояние" или "воспалительное заболевание" в настоящем документе понимают в широком смысле хронические или острые воспалительные заболевания.

Под термином "выделенный" в настоящем документе понимают в широком смысле материал, отделённый от своей исходной окружающей среды, где он существует в природе, и, таким образом, искусственно изменённый относительно своего изначального состояния. Выделенный материал может быть очищен таким образом, что станет по существу очищенным от прочих клеточных компонентов или прочих примесей, например прочих клеточных нуклеиновых кислот или белков, с использованием стандартных способов, хорошо известных в уровне техники. Выделенный материал может быть, например, экзогенной нуклеиновой кислотой, включённой в векторную систему, экзогенной нуклеиновой кислотой, содержащейся в клетке-хозяине, или любым материалом, который был отделён от своей исходной окружающей среды и, таким образом, искусственно изменён (например, "выделенное антитело"). Например, термины "выделенный" или "очищенный" в настоящем документе подразумевают в широком смысле белок, ДНК, антитело, РНК или их биологически активную часть, которые являются по существу чистыми от клеточного материала или примесей других белков данного клеточного или тканевого источника, из которого получена данная биологическая субстанция, или по существу чистыми от химических предшественников или других реактивов в случае химического синтеза. Понятие "по существу чистый от клеточного материала" включает препараты белков KIR2DL1,2 и/или 3, в которых белок отделён от клеточных компонентов тех клеток, из которых он был выделен или в которых он был произведён рекомбинантным путём.

Под термином "константа ассоциации" или "K_a" в настоящем документе понимают в широком смысле степень ассоциации для конкретного взаимодействия антиген-антитело, тогда как под термином "константа диссоциации" или "K_d" в настоящем документе понимают степень диссоциации для конкретного взаимодействия антиген-антитело. Термин "K_D" в настоящем документе предназначен для обозначения константы диссоциации, полученной из отношения K_d к K_a (т.е. K_d/K_a) и выражен в молярной концентрации (М). Значения K_D для антител могут быть определены с использованием способов, хорошо известных в уровне техники.

Под термином "метка" или "детектируемый фрагмент" в настоящем документе понимают в широком смысле соединение, обнаруживаемое посредством спектроскопии, фотохимии, биохимии, иммунохимии, химии или другими способами.

Под терминами "условия низкой жесткости", "условия средней жесткости", "условия высокой жесткости" или "очень жёсткие условия" в настоящем документе понимают в широком смысле условия для гибридизации нуклеиновых кислот и отмывания. Инструкции по проведению реакций гибридизации можно найти в Ausubel, et al. (2002), Short Protocols in Molecular Biology (5th Ed.), John Wiley & Sons, NY. Типичные условия для специфичной гибридизации включают (1) условия низкой жесткости относятся к гибридизации в 6× хлориде натрия/цитрате натрия (SSC) при температуре около 45°C с последующими двумя этапами отмывания в 0,2× SSC, 0,1% SDS по меньшей мере при 50°C (температура отмывания может быть увеличена до 55°C для условий низкой жесткости); (2) условия средней жесткости относятся

к гибридизации в 6× SSC при температуре около 45°C с последующим одним или более этапом отмывания в 0,2× SSC, 0,1% SDS при температуре 60°C; (3) жёсткие условия относятся к гибридизации в 6× SSC при температуре около 45°C с последующим одним или более этапом отмывания в 0,2× SSC, 0,1% SDS при температуре 65°C; и (4) очень жёсткие условия относятся к гибридизации в 0,5 М фосфате натрия, 7% SDS при температуре 65°C с последующим одним или более этапом отмывания в 0,2× SSC, 1% SDS при температуре 65°C, но не ограничиваются ими.

Под термином "млекопитающее" в настоящем документе понимают в широком смысле любое теплокровное позвоночное животное, относящееся к классу млекопитающих, включающему людей, характеризующееся наличием волосяного покрова кожи и наличием молочных желёз у женских особей для вскармливания новорождённых. Примеры млекопитающих включают альпак, броненосцев, капибар, кошек, верблюдов, шимпанзе, шиншилл, крупный рогатый скот, собак, коз, горилл, хомячков, лошадей, людей, лемуров, лам, мышей, приматов, свиней, крыс, овец, землероек, белок и тапиров, но не ограничиваются ими. Млекопитающие включают виды крупного рогатого скота, собачьих, лошадиных, кошачьих, мышей, баранов, свиней, приматов и грызунов, но не ограничиваются ими. Млекопитающие также включают любой вид, внесённый в список Mammal Species of the World, который ведётся в National Museum of Natural History, Smithsonian Institution in Washington DC.

Под термином "молекула нуклеиновой кислоты, встречающаяся в природе" в настоящем документе понимают в широком смысле молекулу ДНК или РНК, имеющую нуклеотидную последовательность, встречающуюся в природе (например, кодирующую природный белок).

Под термином "нуклеиновая кислота" или "последовательность нуклеиновой кислоты" в настоящем документе понимают в широком смысле дезоксирибонуклеиновый или рибонуклеиновый олигонуклеотид либо в одноцепочечной, либо в двуцепочечной форме. Данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, т.е. олигонуклеотиды, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов. Данный термин также охватывает структуры, подобные нуклеиновым кислотам с синтетическим остовом. Если не указано обратное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также охватывает свои консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, которые всегда явно выражены в соответствии с данной последовательностью. Термин нуклеиновая кислота взаимозаменяемо используется здесь с геном, кДНК, мРНК, олигонуклеотидом и полинуклеотидом.

Под термином "функционально связанный" в настоящем документе понимают в широком смысле случай, когда два фрагмента ДНК соединены таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые данными фрагментами, находятся в одной рамке считывания.

Под термином "паратоп" в настоящем документе понимают в широком смысле ту часть антитела, которая распознаёт антиген (например, антигенсвязывающий участок антитела). Паратопы могут представлять собой небольшие районы (например, 15-22 аминокислот) в Fv районе антитела и могут содержать части лёгких и тяжёлых цепей данного антитела. См. Goldsby, et al. Antigens (Chapter 3), Immunology (5th Ed.), New York: W.H. Freeman and Company, pages 57-75.

Под термином "пациент" в настоящем документе понимают в широком смысле любое животное, которое нуждается в лечении либо для облегчения состояния, связанного с заболеванием, либо для предотвращения случая или повторного случая состояния, связанного с заболеванием. Также под термином "пациент" в настоящем документе понимают в широком смысле любое животное, имеющее факторы риска, историю болезни, восприимчивость, симптомы, признаки, которые были диагностированы ранее, находящееся в области риска или являющееся членом группы особей, где имеются пациенты в отношении какого-либо заболевания. Данный пациент может быть клиническим пациентом, таким как человек или животное, такое как домашнее животное, домашний скот, экзотическое животное или животное зоопарка. Термин "субъект" может быть использован взаимозаменяемо с термином "пациент".

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются взаимозаменяемо и подразумевают в широком смысле полимер аминокислотных остатков. Данные термины применимы к полимерам аминокислот, в которых один или более аминокислотный остаток является аналогом или миметиком соответствующей аминокислоты, встречающейся в природе, так же как и встречающимся в природе полимерам аминокислот. Данные термины применимы к полимерам аминокислот, в которых один или более аминокислотный остаток является искусственно созданным миметиком соответствующей аминокислоты, встречающейся в природе, так же как и встречающимся и не встречающимся в природе полимерам аминокислот. Полипептиды могут быть модифицированы, например, добавлением углеводных остатков для формирования гликопротеинов. Термины "полипептид", "пептид" и "белок" включают гликопротеины, а также не гликопротеины.

Под термином "промотор" в настоящем документе понимают в широком смысле набор последовательностей нуклеиновых кислот, который обусловливает транскрипцию нуклеиновой кислоты. Промотор в настоящем документе включает необходимые последовательности нуклеиновых кислот возле сайта инициации транскрипции, например, TATA элемента в случае промотора полимеразы II типа. Промотор также необязательно включает энхансерные или репрессорные элементы, которые могут быть располо-

жены в нескольких тысячах пар оснований от сайта инициации транскрипции. Конститутивный промотор - это промотор, который активен в большинстве условий внешней среды и условий развития. Индуцибельный промотор - это промотор, который становится активным под воздействием внешней среды или регуляции в ходе развития.

Под термином "профилактически эффективное количество" в настоящем документе понимают в широком смысле количество соединения, которое при введении пациенту для профилактики заболевания или предотвращения повторного заболевания результативно оказывает профилактический эффект для данного заболевания или его повторного случая. Профилактически эффективное количество может быть количеством, эффективным для предотвращения проявления признаков и/или симптомов. "Профилактически эффективное количество" для подвергающегося лечению пациента может варьировать в зависимости от заболевания и его серьёзности, а также от возраста, веса, истории болезни, предрасположенности к каким-либо состояниям и предшествующих состояний.

Под термином "профилактика" в настоящем документе понимают в широком смысле курс терапии, при котором признаки и/или симптомы не представлены у пациента, находятся на стадии ремиссии или были ранее представлены у пациента. Профилактика включает предотвращение возникновения заболевания после лечения заболевания у пациента. Далее профилактика включает лечение пациентов, у которых потенциально может развиться заболевание, особенно тех, кто восприимчив к данному заболеванию (например, члены той же группы населения, индивидуумы с факторами риска или с риском развития данного заболевания).

Под термином "рекомбинантный" в настоящем документе в широком смысле в отношении конечного продукта, например клетки или нуклеиновой кислоты, белка или вектора, указывает, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы путём введения гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка или путём изменения нативной нуклеиновой кислоты или белка, или что данная клетка произведена клеткой, модифицированной таким образом. Таким образом, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не встречаются в нативной (не рекомбинантной) форме клетки, или экспрессируют нативные гены, которые экспрессируются анормально, экспрессируются в меньшей степени или вообще не экспрессируются.

Под терминами "специфично (или селективно) связывается" с антителом, или "специфично (или селективно) иммунореагирует с", или "специфично взаимодействует или связывается" в настоящем документе понимают в широком смысле относительно белка или пептида (или другого эпитопа), в некоторых вариантах реакцию связывания, которая определяется наличием данного белка в гетерогенной смеси белков и других биологических соединений. Например, при проведении иммуноанализа в определённых условиях специфичные антитела связываются с конкретным белком по меньшей мере в два раза интенсивнее по отношению к фону (неспецифичному сигналу) и по существу не связываются в значительных количествах с другими белками, находящимися в образце. Как правило, специфичная или селективная реакция будет иметь сигнал, по меньшей мере в два раза превосходящий фоновый сигнал или шум и в более типичном случае превосходящий фон более чем около в 10-100 раз.

Под терминами "специфически гибридизуемый" и "комплементарный" в настоящем документе понимают в широком смысле нуклеиновую кислоту, способную формировать водородные связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты либо посредством обыкновенного Уотсон-Криковского взаимодействия, либо другими нестандартными способами. Свободная энергия связывания молекулы нуклеиновой кислоты с комплементарной ей последовательностью является достаточной для протекания соответствующего процесса, например РНК интерференции. Определение свободных энергий связывания для молекул нуклеиновых кислот хорошо известно в уровне техники. См., например, Turner, et al. (1987), CSH Symp. Quant. Biol. LII: 123-33; Frier, et al. (1986), PNAS, 83:9373-77; Turner, et al. (1987), J. Am. Chem. Soc. 109:3783-85. Процент комплементарности отображает процентный показатель смежных оснований в молекуле нуклеиновой кислоты, которые способны формировать водородные связи (например, Уотсон-Криковское спаривание оснований) с другой молекулой нуклеиновой кислоты (например, по меньшей мере около 5, 6, 7, 8, 9, 10; за пределами 10 будучи комплементарными по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90 и 100% включительно). Термин "полностью комплементарный" или 100% комплементарность подразумевает в широком смысле, что все смежные основания последовательности нуклеиновой кислоты образуют водородные связи с тем же числом смежных оснований во второй последовательности нуклеиновой кислоты. Термин "по существу полная комплементарность" подразумевает полинуклеотидные цепи, демонстрирующие по меньшей мере 90% комплементарность, за исключением таких районов полинуклеотидных цепей, как крайние последовательности, которые можно выделить как некомплементарные. Специфичное связывание требует достаточной степени комплементарности во избежание неспецифичного связывания олигомерного соединения с нецелевыми последовательностями в условиях, где является желательным специфичное связывание, например, в физиологических условиях в случае анализов in vivo или терапевтического лечения или в случае анализов in vitro, в условиях, в которых проводят данные анализы. Нецелевые последовательности могут отличаться по меньшей мере на пять нуклеотидов.

Под термином "признаки" заболевания в настоящем документе понимают в широком смысле лю-

бую аномалию, указывающую на заболевание, которую можно обнаружить при обследовании пациента; признаки являются объективным показателем заболевания в отличие от симптомов, которые являются субъективным показателем заболевания.

Под терминами "твёрдая подложка", "подложка" или "субстрат" в настоящем документе понимают в широком смысле любой материал, предусматривающий твёрдую или полутвёрдую структуру, к которой может быть прикреплён другой материал, включая, но не ограничиваясь, плоские подложки (например, металлические, стеклянные, пластиковые, силиконовые и керамические поверхностями), так же как и материалы с определённой структурой и пористые материалы.

Под термином "субъекты" в настоящем документе понимают в широком смысле любой организм, подходящий для лечения в соответствии с настоящим изобретением, включая субъекты птиц и млекопитающих, предпочтительно млекопитающих, но не ограничиваясь ими. Млекопитающие настоящего изобретения включают собачьих, кошачьих, крупный рогатый скот, козьих, лошадиных, баранов, свиней, грызунов (например, крыс и мышей), зайцеобразных, приматов, людей, но не ограничиваются ими. Приемлемым является любой субъект, относящийся к млекопитающим, который нуждается в терапии, соответствующей настоящему изобретению. Человеческие субъекты обоих полов и на любой стадии развития (например, новорождённый, ребёнок, подросток, юноша/девушка, взрослый) могут подвергаться лечению, соответствующему настоящему изобретению. Настоящее изобретение может быть также использовано на субъектах животных, особенно на субъектах млекопитающих, таких как мыши, крысы, собаки, кошки, крупный рогатый скот, козы, овцы и лошади, для ветеринарных целей, а также в целях скрининга лекарств и разработки лекарств. Термин "субъекты" используется взаимозаменяемо с термином "пациенты".

Под термином "симптомы" заболевания в настоящем документе понимают в широком смысле любой патологический феномен или отклонение от нормы в структуре, функции или восприятии, ощущаемое пациентом и указывающее на наличие заболевания.

Под термином "Т-клетка" в настоящем документе понимают в широком смысле $CD4^+$ Т-клетки и $CD8^+$ Т-клетки. Термин "Т-клетка" также включает Т-клетки, относящиеся к Т-хелперам 1 типа и Т-хелперам 2 типа.

Под терминами "терапия", "терапевтический", "лечебный" или "лечение" в настоящем документе понимают в широком смысле лечение заболевания, останавливающее или снижающее развитие данного заболевания или его клинических симптомов, и/или облегчение заболевания, вызывающее регрессию данного заболевания или его клинических симптомов. Терапия охватывает профилактику, лечение, излечение, снижение, облегчение и/или обеспечение выздоровления от заболевания, признаков и/или симптомов заболевания. Терапия охватывает облегчение признаков и/или симптомов у пациентов с выраженными признаками и/или симптомами заболевания (например, с воспалением, болью). Терапия также охватывает термин "профилактика". Под термином "сниженный", в отношении терапии, понимают в широком смысле клинически значимое снижение признаков и/или симптомов. Терапия включает лечение рецидивов или повторного проявления признаков и/или симптомов (например, воспаления, боли). Терапия охватывает предотвращение проявления признаков и/или симптомов в любой момент, так же как и снижение и/или устранение имеющихся признаков и/или симптомов, но не ограничивается ими. Терапия включает лечение хронического заболевания ("поддержание") и острого заболевания. Например, терапия включает лечение или предотвращение рецидивов или повторного проявления признаков и/или симптомов (например, воспаления, боли).

Под термином "вариабельный район" (VR) в настоящем документе подразумеваются домены в каждой паре лёгких и тяжёлых цепей антитела, участвующие непосредственно в связывании антигена. Каждая тяжёлая цепь имеет на одном конце вариабельный домен (V_H), за которым следует несколько константных доменов. Каждая лёгкая цепь имеет вариабельный домен (V_L) на одном конце и константный домен на другом конце; константный домен лёгкой цепи расположен на одном уровне с первым константным доменом тяжёлой цепи, и вариабельный домен лёгкой цепи расположен на одном уровне с вариабельным доменом тяжёлой цепи.

Под термином "вектор" в настоящем документе подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, способная к переносу другой молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она была связана. Одним типом вектора является "плазмида", представляющая собой кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК, в которую могут быль лигированы дополнительные фрагменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные фрагменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Истинные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный участок инициации репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, не эписомные векторы млекопитающих) после введения в клетку-хозяина встраиваются в её геном и, таким образом, реплицируются вместе с хозяйским геномом. Кроме того, определённые векторы способны направлять экспрессию генов, с которым они искусственно соединены. Такие векторы здесь обозначаются как "рекомбинантные экспрессионные векторы" или просто "экспрессионные векторы". В целом экспрессионные векторы для методов молекулярного клонирования часто представлены плазмидами. В настоящем описании термины "плазмида" и "вектор" могут

быть взаимозаменяемы, так как плазмида является наиболее часто используемым типом вектора. Однако настоящее изобретение также предназначено для использования других вариантов экспрессионных векторов, таких как вирусные векторы (например, дефектные ретровирусы, не способные к репликации, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), выполняющих аналогичные функции. Методика основана главным образом на стандартных способах, хорошо известных в уровне техники и описанных в различных литературных источниках общего плана и более специфичных, цитируемых и обсуждаемых в данном описании. См., например, Sambrook, et al. (2001), Molec. Cloning: Lab. Manual [3rd Ed] Cold Spring Harbor Laboratory Press. Стандартные методы могут быть использованы для работы с рекомбинантной ДНК, для синтеза олигонуклеотидов, для работы с клеточными культурами и для трансформации (например, электропорацией, липофекцией). Ферментативные реакции и очистка могут быть выполнены согласно инструкциям производителя, общепринятыми в уровне техники методами или так, как описано здесь. Используемая терминология, связанная с описаниями, лабораторные методики, относящиеся к аналитической химии, синтезу органических соединений, медицинской и фармацевтической химии, являются хорошо известными и широко используются в уровне техники. Стандартные методики могут быть использованы для химических синтезов, химических анализов, синтеза и доставки фармацевтических препаратов, а также лечения пациентов.

Ингибирующие рецепторы NK-клеток KIR2DL1, 2 и 3.

Рецепторы KIR - это гликопротеины клеточной поверхности, включающие в себя от одного до трёх внеклеточных иммуноглобулин-подобных доменов, экспрессируемых некоторыми Т-клетками, так же как и большинством NK=клеток человека. Несколько рецепторов KIR хорошо описаны (см., например, Carrington and Norman, The KIR Gene Cluster, May 28, 2003, доступно через сайт Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI)). Рецепторы KIR человека подразделяются на KIR2DL и KIR3DL (рецепторы KIR также могут быть упомянуты под различными другими названиями, такими как CD158e1, CD158k, CD158z, p58 KIR CD158e1 (p70), CD244 (см., например, опубликованную заявку США номер 2004/0038894, Radaev et al., Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 32:93-114 (2003), Cerweknka 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 которых включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме). Структура нескольких рецепторов KIR хорошо изучена, между этими белками выявляется высокое структурное сходство. См. выше, например, Radaev et al.

Рецепторы KIR могут быть классифицированы как со структурной, так и с функциональной точки зрения. Например, большинство рецепторов KIR имеют два Ig-домена, (KIR2D, 58 кДа), тогда как другие имеют три Ig-домена (KIR3D, 70 кДа) (иногда они упоминаются как белки p58 и p70 соответственно). Рецепторы KIR также различаются между собой по длине цитоплазматического конца. Как правило, рецепторы KIR с относительно длинным цитоплазматическим концом (L) передают ингибирующий сигнал, тогда как KIR с коротким цитоплазматическим концом (S) могут активировать иммунные ответы NK-клеток или Т-клеток. В соответствии с этим номенклатура рецепторов KIR может быть основана на количестве внеклеточных доменов (KIR2D или KIR3D), а также на наличии длинного (KIR2DL или KIR3DL) или короткого (KIR2DS или KIR3DS) цитоплазматического конца.

Дополнительная информация по номенклатуре рецепторов KIR представлена в разделе "Подробное описание" предпочтительного варианта осуществления настоящего изобретения. Некоторые представители семейства рецепторов KIR - рецепторы NKCAR или, в частности, рецепторы KAR (например, KIR2DS2 и KIR2DS4); они, как правило, содержат один или более заряженный аминокислотный остаток в трансмембранном участке (например, лизин), который ассоциирован с адаптерной молекулой, несущей иммуностимуляторный фрагмент (ITAM) (например, DAP 12). Цитоплазматическая часть ингибирующих рецепторов KIR обычно содержит один или более фрагмент ITIM, который привлекает фосфатазы. Ингибирующие рецепторы KIR связываются с альфа1/альфа2 доменами молекул HLA. Ингибирующие рецепторы KIR, как правило, не проявляют потребности в связывании с адаптерной молекулой для проявления активности. В том случае, если не оговорено обратное, термины "KIR", "рецепторы KIR" и им подобные относятся к KIR2DL1, 2 и/или 3 представителям семейства KIR, и термины "KAR", "рецепторы KAR" и им подобные относятся к NKCAR представителям семейства KIR.

Рецепторы KIR могут связывать молекулы MHC-I (например, некоторые аллотипы HLA класса I), что, как правило, приводит к передаче негативного сигнала, который противодействует и может подавить стимулирующие сигналы, таким образом, в NK-клетке активируется сигнализация, предотвращающая уничтожение NK-клеткой ассоциированной клетки мишени (вероятно, посредством фосфорилирования ITIM и привлечения тирозинфосфатаз (например, тирозифосфатазы, содержащие домен SH2, такие как SHP-1 и SHP-2), приводящим к дефосфорилированию PTK (например, Syk, TcR и/или ZAP70) и/или ингибированию формирования комплекса LAT/PLC и связанному с этим нарушению каскада (каскадов) ITAM). Поскольку вирусы часто подавляют экспрессию MHC класса I в инфицируемых ими клетках, такие инфицированные клетки становятся восприимчивыми к уничтожению NK-клетками. В инфицированных клетках может также меняться набор белков, связанных с MHC, вследствие гликозилирования. Если это происходит, то экспрессируемый клеткой белковый комплекс MHC-I будет изменён. Если ре-

цепторы KIR NK-клеток не смогут связаться с этими "чужеродными" комплексами, ингибирующий сигнал не сможет возникнуть и лизис будет продолжен.

Все подтверждённые ингибирующие рецепторы KIR, по-видимому, взаимодействуют с разными наборами антигенов HLA/MHC в зависимости от подтипа KIR. У человека рецепторы KIR, имеющие два Ig домена (KIR2D), распознают аллотипы HLA-C: KIR2DL2 (ранее обозначаемый p58.2) и продукт близкородственного гена KIR2DL3 оба распознают эпитоп, входящий в группу 1 аллотипов HLA-C (Cw1, 3, 7 и 8), тогда как KIR2DL1 (p58.1) распознаёт эпитоп, входящий во взаимосоответствующую группу 2 аллотипов HLA-C (Cw2, 4, 5 и 6). Специфичость KIR2DL1, по-видимому, определяется наличием остатка лизина в положении 80 аллелей группы 2 HLA-C. У KIR2DL2 и KIR2DL3 способность к распознаванию, по-видимому, определяется наличием остатка аспарагина в положении 80. Подавляющее большинство аллелей HLA-C имеют либо остаток аспарагина, либо остаток лизина в положении 80. Один KIR с тремя Ig доменами, KIR3DL1 (p70), распознаёт эпитоп, входящий в группу аллелей HLA-Bw4. Наконец, гомодимер молекул с тремя Ig доменами, KIR3DL2 (pi40), распознаёт HLA-A3 и -A11.

Отдельно взятые рецепторы NK-клетки любого типа (активирующие или ингибирующие), специфичные к MHC-I, как правило, не взаимодействуют со всеми молекулами MHC класса I, но специфично связываются с конкретными аллотипами (белками, кодируемыми различными вариантами одного локуса генома). Также отдельно взятая NK-клетка может экспрессировать несколько различных ингибирующих и/или активирующих рецепторов, которые функционируют независимо друг от друга. Например, у человека наличие или отсутствие определённого KIR меняется от одной NK-клетки к другой внутри одного организма. У людей также наблюдается относительно высокий уровень полиморфизма рецепторов KIR, определённые молекулы KIR представлены не во всех организмах, а только в некоторых. Хотя рецепторы KIR и другие ингибирующие рецепторы, распознающие MHC, могут быть коэкспрессированы NK-клетками, в любом наборе NK-клеток отдельно взятого организма существуют типичные клетки, экспрессирующие единственный KIR; следовательно, соответствующая активность у данного последнего типа NK-клеток ингибируется только клетками, экспрессирующими специфический набор аллелей MHC-I. По сути, недавние оценки степени разнообразия генотипа KIR людей показывают, что вероятность наличия идентичных генотипов у людей, не состоящих в родстве, составляет <0,24%. Наиболее распространённый Кавказский гаплотип, гаплотип A (частота встречаемости ~47-59%), содержит только один ген активирующего KIR (KIR2DS4) и шесть локусов ингибиторного KIR (KIR3DL3, -2DL3, -2DL1, -2DL4, -3DL1 и -3DL2). Остальные гаплотипы "B" очень разнообразны и содержат 2-5 локусов активирующего KIR (включая KIR2DS1, -2DS2, -2DS3 и -2DS5).

Следует отметить, что рецепторы KIR обозначаются несколькими названиями, как показано в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Номенклатура KIR

KIR	Полное название	Другие варианты	Номер ID	SEQ ID NO
KIR2DL1	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, два домена, длинный цитоплазматический конец,	cl-42, nkatl, 47.11, p58.1, CD158a	L41267	11
KIR2DL2	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, два домена, длинный цитоплазматический конец,	cl-43, nkat6, CD158bl	L76669	12
KIR2DL3	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, два домена, длинный цитоплазматический конец, 3	cl-6, nkat2, nkat2a, nkat2b, p58, CD158b2	L41268	13
KJR2DL4	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, два домена, длинный цитоплазматический конец, 4	103AS, 15.212, CD158d	X97229	14
KIR2DL5A	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, два домена, длинный цитоплазаматический конец, 5A	KIR2DL5.1, CD158f	AF217485	15

KJR2DL5B	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, два домена, длинный цитоплазматический конец, 5B	KIR2DL5.2, KIR2DL5.3, KIR2DL5.4	AF217486	
KJR2DS1	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, два домена, короткий цитоплазматический конец, 1	EB6ActI, EB6ActII, CD158h	X89892	16
KIR2DS2	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, два домена, короткий цитоплазматический конец, 2	cl-49, nkat5, 183ActI, CD158j	L76667	17
KIR2DS3	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, два домена, короткий цитоплазматический конец, 3	nkat7	L76670	18
KIR2DS4	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, два домена, короткий цитоплазматический конец, 4	cl-39, KKA3, nkat8, CD158i	L76671	19
KIR2DS5	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, два домена, короткий цитоплазматический конец, 5	nkat9, CD158g	L76672	20
KIR2DP1	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, два домена, псевдоген 1	KIRZ, KIRY, KIR15, KIR2DL6	AF204908	
KIR3DL1	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, три домена, длинный цитоплазматический конец, 1	cl-2, NKB1, cl-11, nkat3, NKB1B, AMB11, KIR,	L41269	21

KIR3DL2	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, три домена, длинный цитоплазматический конец, 2	cl-5, nkat4, nkat4a, nkat4b CD158k	L41270	22
KIR3DL3	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, три домена, длинный цитоплазматический конец, 3	KIRC1, KIR3DL7, KIR44, CD158z	AF352324	23
KIR3DS1	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, три домена, короткий цитоплазматический конец, 1	nkatl0, CD158e2	L76661	24
KIR3DP1	киллерный иммуноглобулин-подобный рецептор, три домена, псевдоген 1	KIRX, KIR48, KIR2DS6, KIR3DS2P,	AF204919, AF204915 - AF204917	

Получено с сайта Комитета по номенклатуре "Hugo Gene".

Таблица 2

KIR по CD-номенклатуре

Название 1	**Название 2**	**CD обозначение**
KIR3DL7	KIRC1	CD158z
KIR2DL2/L3	p58.2/p58.3	CD158bl/b2
KIR2DL1	p58.1	CD158z
KIR2DS6	KIRX	CD158bl/b2
KIR2DL4	-	CD 158c
KIR3DL1/S1	p70	CD158d
KIR2DL5	-	CD158el/e2
KIR2DS5	-	CD158f
KIR2DS1	p50.1	CD158h
KIR2DS4	p50.3	CD158i
KIR2DS2	p50.2	CD158j
KIR3DL2	pl40	Cdl58k

Andre, et al. Nature Immunol. 2(8):661 (2001).

Типичные молекулы KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 и KIR2DS4 содержат следующие аминокислотные последовательности соответственно.

Внеклеточный домен KIR2DL1:

HEGVHRKPSLLAHPGXLVKSEETVILQCWSDVMFEHFLLHREGMFNDTLRLI GEHHDGVSKANFSISRMTQDLAGTYRCYGSVTHSPYQVSAPSDPLDIVIIGLYEKPSL SAQXGPTVLAGENVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHERRLPAGPKVNGTFQADFPL GPATHGGTYRCFGSFHDSPYEWSKSSDPLLVSVTGNPSNSWPSPTEPSSKTGNPRHLH (SEQ ID NO: 7), где "X" в положении 16 представляет собой P или R и "X" в положении 114 представляет собой P или L, представляя аллельные разновидности.

Внеклеточный домен KIR2DL2:

HEGVHRKPSLLAHPGRLVKSEETVILQCWSDVRFEHFLLHREGKFKDTLHLIG EHHDGVSKANFSIGPMMQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSL SAQPGPTVLAGESVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHECRFSAGPKVNGTFQADFPLG PATHGGTYRCFGSFRDSPYEWSNSSDPLLVSVIGNPSNSWPSPTEPSSKTGNPRHLH (SEQ ID NO: 8).

Внеклеточный домен KIR2DL3:

HEGVHRKPSLLAHPGPLVKSEETVILQCWSDVRFQHFLLHREGKFKDTLHLIG EHHDGVSKANFSIGPMMQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSL SAQPGPTVLAGESVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHERRFSAGPKVNGTFQADFPLG PATHGGTYRCFGSFRDSPYEWSNSSDPLLVSVTGNPSNSWPSPTEPSSETGNPRHLH (SEQ ID NO: 9).

Внеклеточный домен KIR2DS4:

QEGVHRKPSFLALPGHLVKSEETVILQCWSDVMFEHFLLHREGKFNNTLHLI GEHHDGVSKANFSIGPMMPVLAGTYRCYGSVPHSPYQLSAPSDPLDMV (SEQ ID NO: 10).

Нейтрализация ассоциированного с KIR2DL1, 2, и/или 3 ингибирования NK-клеток.

Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела могут быть охарактеризованы на основе своей способности блокировать или нейтрализовать ингибирование NK и, таким образом, усиливать активность NK-клеток против клеток мишеней, которая в другом случае была блокирована (например, Т-клетки, $CD4^+$ Т-клетки). Как отмечено выше, анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела, которые связываются по меньшей мере с одним KIR2DL1, 2 и/или 3 на достаточный промежуток времени, чтобы нейтрализовать опосредованное KIR2DL1, 2 и/или 3 ингибирование цитотоксичности NK-клеток, могут быть использованы в контексте описания настоящего изобретения. Такие анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела могут быть использованы напрямую как терапевтические агенты в нативной форме. Более существенной преимущественной особенностью настоящего изобретения являются анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела, которые перекрёстно реагируют с двумя или более рецепторами KIR2DL1, 2 и/или 3 и нейтрализуют ингибирующую активность, ассоциированную с некоторыми или всеми (предпочтительно со всеми) рецепторами KIR2DL1, 2 и/или 3.

Нейтрализующие анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела могут частично или полностью нейтрализовать опосредованное KIR2DL1, 2 и/или 3 ингибирование цитотоксичности NK-клеток. Под нейтрализацией понимается любая существенная блокировка ингибирующих сигналов, которые присутствуют в обратном случае. Нейтрализация может быть измерена любым подходящим способом. С одной стороны, нейтрализация ингибирования отображается в том, что анти-KIR нейтрализующее антитело приводит по меньшей мере к около 20%, предпочтительно по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75% или более (например, около 25-100%) увеличению специфического лизиса NK-клетками в определённой смеси NK и клеток мишеней NK в сравнении со степенью специфического лизиса, который происходит по существу в идентичных условиях без анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела (антител). Увеличение процентного показателя в этом случае может быть определено при рассмотрении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 или других антител путём, например, сравнения результатов цитотоксического теста с радиоактивным хромом смеси клеток мишеней NK (например, Т-клеток, любая подходящая клеточная линия) и NK-клеток с незаблокированным ассоциированным KIR2DL1, 2 и/или 3 (100%) с результатами теста смеси NK-клеток и клеток мишеней NK, в которой клетки мишени NK представляют лиганд для KIR2DL1, 2 и/или 3 (0%). В случае наличия анти-KIR антител можно провести сравнение результатов цитотоксического теста с радиоактивным хромом смеси клеток мишеней NK и NK-клеток с незаблокированным ассоциированным KIR (100%) с результатами теста смеси NK-клеток и клеток мишеней NK, в которой клетки мишени NK несут распознаваемую молекулу MHC класса I для ингибирующих KIR на поверхности NK-клеток (0%). В преимущественном аспекте настоящее изобретение предусматривает анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела, индуцирующие лизис клетки (клеток), которые не могут быть эффективно лизированы без присутствия такого анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела. Альтернативно, нейтрализация ингибирующей активности KIR2DL1, 2 и/или 3 может быть выявлена путём, например, цитотоксического теста с радиоактивным хромом с использованием клона NK-клетки или трансфектанта, экспрессирующего один или несколько ингибирующих рецепторов KIR2DL1, 2 и/или 3 (например, KIR, NKG2, NKG2A, LIR (например, LILRB1, LILRB5), и клетку мишень, экспрессирующую только один лиганд (например, полипептид HLA или его аллель, HLA-E), который распознаётся одним из KIR2DL1, 2 и/или 3 на поверхности NK-клетки, в котором уровень цитотоксичности, полученный с помощью антитела, составляет по меньшей мере около 20%, например, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере, около 40%, по меньшей мере, около 50%, по меньшей мере, около 60%, по меньшей мере, около 70% или более (например, около 25-100%) от уровня цитотоксичности, наблюдаемого при использовании известного блокирующего антитела для лиганда KIR2DL1, 2 и/или 3. Например, при тестировании анти-KIR антитела, в почти идентичные условия вводится молекула анти-MHC класса I, такая как W6/32 анти-MHC класса I антитело (которое в настоящий момент доступно, например, от Research Diagnostics, Flanders, NJ, USA и описано, например, Shields et al., Tissue Antigens. 1998 May; 51(5):567-70).

Цитотоксические тесты с радиоактивным хромом и другие способы определения цитолитической активности NK-клеток известны в уровне техники. Подходящие условия для подобных анализов также хорошо известны. Обычный цитотоксический тест с радиоактивным хромом проводится путём мечения клеток мишеней (например, Cw3 и/или Cw4-положительные клеточные линии в количестве, например, около 5000 клеток на лунку микропланшета) $Na_2{}^{51}CrO_4$ (из условий, чтобы ^{51}Cr поглощался и удерживался жизнеспособными клетками мишенями) с отмывкой для удаления избыточной радиоактивности, затем их подвергают воздействию NK-клеток примерно на 4 ч в присутствии или в отсутствие анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела (антител) с подходящим отношением эффектора и мишени (например, 4:1) с измерением образовавшегося уровня ^{51}Cr, отображающего гибель и лизис клеток-мишеней. 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 ^3H-тимидином, который встраивается в реплицирующую-

ся ДНК. Под цитолитическим действием NK-клеток ДНК клеток мишеней быстро фрагментируется и остаётся в фильтрате, тогда как крупную нефрагментированную ДНК можно собрать на фильтре таким образом, чтобы было возможно измерить либо выход этих фрагментов, либо количество H-тимидина в клеточной ДНК. Другие примеры и обсуждение, относящееся к подобным анализам можно найти, например, в WO 2006/072625.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела, охарактеризованные по способности конкурировать с перекрёстно реагирующими и/или нейтрализующими анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителами за связывание с близкородственными рецепторами KIR2DL1, 2 и/или 3 и/или по способности связываться с тем же самым районом/эпитопом антигенной детерминанты, как это делают антитела, для которых это известно. Когда выражение "конкурирует с" относится к отдельному моноклональному антителу (например, 1-7F9), это означает, что анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело конкурирует с антителом сравнения или с другой молекулой в анализе связывания с использованием либо рекомбинантных KIR2DL1, 2 и/или 3 молекул, либо поверхностно экспрессированных KIR2DL1, 2 и/или 3 молекул. Например, если анти-KIR антитело заметно уменьшает связывание 1-7F9 с молекулой KIR, которое идёт нормально в анализе на связывание, можно сказать, что анти-KIR антитело "конкурирует" с 1-7F9. Анти-KIR антитело, которое "конкурирует" с 1-7F9, может конкурировать с 1-7F9 за связывание с KIR2DL1 рецептором человека, с KIR2DL2/3 рецептором человека или с обоими KIR2DL1 и KIR2DL2/3 рецепторами человека.

Хотя описание белка в показателях конкуренции со связывающимся белком сравнения и описание способности данного белка к связыванию с тем же самым или почти тем же самым эпитопом, который связывает белок сравнения, часто являются близкими, в некоторых случаях данные характеристики предполагают наличие существенно различающихся биологических и физико-химических свойств. Конкуренция между связывающимися белками подразумевает, что тестируемое анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело связывается с эпитопом, который, по меньшей мере, частично совпадает с эпитопом, связываемым анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителом или находится достаточно близко к такому эпитопу, так что такое анти-KIR антитело конкурирует с известными анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителами из-за стерических препятствий. Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело может конкурировать с анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителом сравнения без связывания с тем же самым или подобным эпитопом вследствие крупного размера этих антител. Даже если подобное конкурирующее анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело связывается с другой антигенной детерминантой, оно может быть полезно при блокировке взаимодействий, ассоциированных с тем же самым антиген-детерминирующим районом, что и анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело сравнения.

В другом типичном аспекте настоящее изобретение предусматривает анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело, которое связывается с почти тем же антиген-детерминирующим районом, что и доступное анти-KIR антитело, такое как 1-7F9, DF200 и/или NKVSF1. См., например, WO 2006/003179.

Под конкуренцией понимают любое существенное снижение склонности определённой молекулы к связыванию определённого партнёра в присутствии другой молекулы, связывающей данного партнёра. Как правило, конкуренция обозначает по меньшей мере около 15% снижения связывания, например, по меньшей мере около 20% снижения связывания (например, снижение связывания около 25% и более, около 30% и более, около 15-35%) между, например, анти-KIR антителом и по меньшей мере одним KIR в присутствии конкурирующей молекулы, например, анти-KIR антитела. В таких конкретных ситуациях, когда эпитопы, принадлежащие к конкурирующим антителам, расположены близко друг к другу в антигене, конкуренция может составлять более чем около 40% относительного ингибирования связывания рецептора (например, KIR), по меньшей мере около 50% ингибирования, по меньшей мере около 55% ингибирования, по меньшей мере около 60% ингибирования, по меньшей мере около 75% ингибирования или более высокий уровень ингибирования (такой, как уровень ингибирования около 45-95%).

Оценка ингибирования, как правило, включает определение уровня относительного ингибирующего связывания с использованием одного количества первой молекулы (например, анти-KIR антитела); другого количества второй молекулы (например, известного анти-KIR антитела) и третьего количества третьей молекулы (например, KIR), где первое, второе и третье количества являются достаточными, чтобы сделать сравнение, дающее информацию о селективности и/или специфичности этих молекул, рассматриваемых относительно других присутствующих молекул. Обычно для анализа конкуренции с помощью ИФА используют около 5-50 мкг (например, 10-50 мкг, около 20-50 мкг, около, 5-20 мкг, около 10-20 мкг) анти-KIR антитела, известного анти-KIR антитела и не менее одного KIR, чтобы оценить факт существования конкуренции. Условия также должны быть подходящими для связывания конкурирующих молекул с их предполагаемой/известной мишенью. Физиологические или близкие к ним условия (например, температуры около 20-40°C, pH около 7-8), как правило, могут быть подходящими для комплекса анти-KIR антитела с KIR.

Конкуренция (или относительное ингибирование связывания) между двумя или более молекулами может быть определена с использованием иммуноанализов, в которых контрольная KIR2DL1, 2 и/или 3-связывающая молекула (антитело 1-7F9, например) и исследуемое анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело смешивают (или преадсорбируют) и наносят на образец, содержащий соответствующие рецепторы KIR,

такие как совместно KIR2DL1 и KIR2DL2/3 (известно, что каждый из них связывается с DF200). Для использования в подобных изучениях конкуренции подходят методы, основанные на ИФА, радиоиммуноанализах, Вестерн-блоттинг и им подобные. ИФА для изучения конкуренции, как правило, проводят в условиях, подходящих для связывания молекул (например, в физиологических условиях, особенно при работе с антителами, связывающими конформационные/нелинейные эпитопы). Конкуренция также может быть измерена, например, методом проточной цитометрии, SPR-анализом и другими методами, 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, (5th edition), John Wiley & Sons (2002) и Muller, Meth. Enzymol. 92:589-601 (1983)).

Район антигенной детерминанты или эпитоп может быть идентифицирован несколькими известными методами. Например, район антигенной детерминанты может быть быстро идентифицирован с помощью анализа "отпечатков пальцев", такого как химическая модификация экспонированных аминогрупп/карбоксильных групп белков мишеней KIR2DL1, 2 и/или 3. Особым примером подобного метода отпечатка пальцев является использование HXMS (водородно-дейтериевого обмена, регистрируемого методом масс-спектрометрии), где происходит водород/дейтериевый обмен амидных групп рецептора и лигандного белка, связывание и обратный обмен, при этом амидные группы склета, участвующие в связывании белков, защищены от обратного обмена и поэтому сохраняют включённый дейтерий. Значимые районы могут быть идентифицированы на этой стадии с помощью пепсинового протеолиза, быстрой высокоэффективной жидкостной хроматографии микрообразцов и/или масс-спектрометрии, где ионизация происходит с помощью электрораспыления. См., например, Ehring H., Analytical Biochemistry, Vol. 267 (2), p. 252-259 (1999) и/или Engen, J.R. and Smith, D.L. (2001), Anal. Chem. 73, 256A-265A.

Другим примером удобного метода идентификации эпитопа является картирование эпитопа ядерным магнитным резонансом (ЯМР), где, как правило, сравниваются участки сигналов в двумерных спектрах ЯМР, соответствующие свободному антигену и антигену в комплексе с антигенсвязывающим пептидом, таким как антитело. Обычно антиген селективно метят ^{15}N изотопом, так что в спектре ЯМР наблюдаются только сигналы, соответствующие антигену, но не антигенсвязывающему пептиду. Сигналы антигена, идущие от аминокислот, участвующих во взаимодействии с антигенсвязывающим пептидом, как правило, сдвигают позицию в спектре, соответственно этому комплексу, по сравнению со спектрами свободного антигена, и таким способом могут быть определены аминокислоты, участвующие в этом связывании. См., например, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44):149-67; Huang, et al., Journal of Molecular Biology, 281(1):61-67 (1998); и Saito and Patterson, Methods. 1996 Jun; 9(3):516-24.

Картирование/характеристика эпитопа также может быть проведена с использованием способов масс-спектрометрии. См., например, Downward, J. Mass Spectrom. 2000 Apr; 35(4):493-503 и Kiselar and Downard, Anal Chem. 1999 May 1; 71(9):1792-801.

Методы расщепления протеазами также могут быть полезными в плане картирования и идентификации эпитопов. Значимые районы/последовательности антигенной детерминанты могут быть определены с помощью расщепления протеазами, например расщепления при 37°C и pH 7-8 с использованием трипсина в соотношении около 1:50 к KIR2DL1, 2 и/или 3, за которым следует масс-спектрометрический (MS) анализ для идентификации пептида. Пептиды, защищенные от расщепления трипсином посредством связывания с анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителами, можно впоследствии идентифицировать путём сравнения образцов, подверженных расщеплению трипсином, и образцов, проинкубированных с антителом и затем подверженных воздействию, например, трипсина (оставляя отпечаток связывающего агента таким образом). Другие ферменты, такие как химотрипсин, пепсин, могут быть также или альтернативно использованы в подобных способах характеристики эпитопов. Более того, ферментативное расщепление является быстрым способом для определения того, находится ли последовательность потенциальной антигенной детерминанты внутри района KIR2DL1, 2 и/или 3, защищенного анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 полипептидом, который не экспонирован на поверхности и, соответственно, наиболее вероятно не проявляет антигенных свойств. Обсуждение подобных методов см., например, в Manca, Ann 1st Super Sanita, 1991; 27(1):15-9.

Разнообразные методы фагового дисплея также могут быть 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 также могут быть идентифицированы с помощью модифицированных методов, подобных методу фагового дисплея (см. Mumey et al., J. Comput. Biol. 10:555-567 и Mumey, Proceedings of the Sixth Annual International Conference on Computational Molecular Biology (RECOMB-02), p. 233-240 (ACM Press, New York)) для обсуждения (см. также Bailey et al., Protein Science (2003), 12:2453-2475; Dromey 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 эпитопа посредством конкурентного связывания с KIR двух KIR-связывающих молекул, где одна из них биотинилирована (например, известное анти-KIR антитело) или аналогично мечена другим способом, является другим способом идентификации значимых районов антигенной де-

терминанты.

Другие потенциально полезные способы картирования эпитопов включают методы кристаллографии, методы рентгеновской дифракции (такие как методы рентгеновской дифракции/изучения последовательностей, разработанные Полаком и др. в 1970-1980-х гг.) и применение технологии пептидного синтеза Multipin.

Способы компьютерного анализа, такие как анализ последовательности и анализ трёхмерной структуры, и делеционный анализ также могут быть использованы для идентификации антигенных детерминант. Например, эпитоп также может быть определён с помощью молекулярного моделирования с использованием структуры KIR2DL1, 2 и/или 3 или его части с докингом структуры Fab фрагмента у отдельно взятого моноклонального антитела. Модели рецепторов KIR2DL1, 2 и/или 3 могут быть созданы путём гомологичного моделирования с KIR2DL1, 2 и/или 3, структура которых охарактеризована, с использованием таких программ, как MOE (Molecular Operating Environment), которая доступна в 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 (1994), J. Virol. Methods. 49(2):209-19).

Характеристики анти-KIR антител.

Наиболее полезные анти-KIR антитела могут быть классифицированы на основе функциональных характеристик, в частности, с учётом их способности перекрёстно реагировать или перекрёстно связываться более чем с одним KJR, таким как ингибирующий KIR, и/или способности эффективно нейтрализовать ингибирующие сигналы NK.

Анти-KIR антитела, которые эффективно связываются более чем с одним типом KIR, являются преимущественной особенностью настоящего изобретения. В частном аспекте настоящее изобретение предусматривает, например, анти-KIR антитела, которые связываются по меньшей мере с двумя ингибирующими рецепторами KIR на поверхности NK-клеток. В конкретном иллюстративном аспекте настоящее изобретение предусматривает анти-KIR антитела, которые связываются с общим районом антигенной детерминанты рецепторов KIR2DL человека. В ещё более конкретном специфическом аспекте настоящее изобретение предусматривает анти-KIR антитело, которое связывается с рецепторами KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Термин "KIR2DL2/3" может быть использован для обозначения любого из KIR2DL2 и KIR2DL3 рецепторов или их вместе. Эти два рецептора имеют очень высокий уровень гомологии, являются аллельными формами одного гена и могут рассматриваться в уровне техники как взаимозаменяемые во многих отношениях. Соответственно, KIR2DL2/3 может рассматриваться в конкретных отношениях как одна ингибирующая KIR молекула. Тогда как анти-KIR антитела, перекрёстно реагирующие с KIR2DL2/3, включены в настоящее изобретение, анти-KIR антитела, имеющие профиль связывания KIR, который содержит только KIR2DL2 или KIR2DL3, не считаются перекрёстно реагирующими.

Поскольку по меньшей мере около в 90% человеческой популяции представлен по меньшей мере один из KIR2DL1 и KIR2DL2/3, перекрёстно реагирующие на KIR2DL1 - KIR2DL2/3 анти-KIR антитела могут стимулировать или усиливать активность NK против большинства клеток, ассоциированных с аллотипами HLA-C, соответственно с аллотипами HLA-C группы 2 и аллотипами HLA-C группы 1. Композиция, содержащая одно перекрёстно реагирующее с KIR антитело, имеющее подобную перекрёстную реактивность, может быть использована для лечения и/или диагностики большинства испытуемых, таким образом устраняя необходимость создания генетического профиля пациента и сокращая количество разных антител, которые необходимо ввести пациенту для обеспечения эффективного результата.

Перекрёстно реагирующие анти-KIR антитела могут иметь любую подходящую структуру и могут быть получены несколькими удобными способами. Например, перекрёстно реагирующее анти-KIR антитело может содержать несколько KIR-лигандов и/или последовательностей против анти-KIR антител, связывающихся с разными рецепторами KIR, которые могут быть ассоциированы путём конъюгации, мультимеризации или (в случае пептидных лигандов) путём включения в белок слияния. В другом аспекте предусмотрено анти-KIR антитело, которое включает в себя последовательности против анти-KIR антитела из перекрёстно реагирующего анти-анти-KIR антитела.

Известны перекрёстно реагирующие анти-анти-KIR антитела, из которых могут быть получены или выделены KIR-связывающие последовательности. Примером такого антитела является антитело NKVSF1 (также упоминаемое как моноклональное антитело pan2D; распознающее общий эпитоп CD158a (KIR2DL1), CD158b (KIR2DL2) и p50.3 (KIR2DS4)), имеющее последовательности вариабельного района и CDR изображённые, например, на фиг 15 WO 2006/003179 (Innate Pharma; Novo Nordisk; University of Genoa). Моноклональное антитело DF200, реагирующее с разными представителями семейства KIR, включая KIR2DL1 и KIR2DL2/3, является другим примером подобного перекрёстно реагирующего антитела. Гибридома, продуцирующая DF200, хранится в коллекции культур CNCM под идентификационным номером "DF200", регистрационным номером CNCM I-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. Может быть создано ещё несколько моноклональных антител и показано, что они действительно являются перекрёстно реагирующими анти-анти-KIR антителами. В данный момент другими

примерами являются антитела 1-7F9 и 1-4F1, описанные в WO 2006/003179.

Перекрёстно реагирующее анти-KIR антитело может обладать любой соответствующей аффинностью и/или авидностью к двум или более рецепторам KIR, с которыми оно связывается. Аффинностью называется сила связывания с эпитопом или антигенной детерминантой анти-KIR антитела или другого антигенсвязывающего белка. Как правило, аффинность измеряется в единицах константы диссоциации K_d, определяемой как [Ab]×[Ag]/[Ab-Ag], где [Ab-Ag] - молярная концентрация комплекса антигена с антителом, [Ab] - молярная концентрация свободного антитела и [Ag] - молярная концентрация свободного антигена. Константа аффинности K_a определяется как $1/K_d$. Подходящие методы для определения специфичности и аффинности связывающего пептида путём конкурентного ингибирования, равновесного диализа и т.п., 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) и Muller, Meth. Enzymol. 92:589-601 (1983).

Обычно анти-KIR антитело, полученное в данном изобретении, имеет аффинность по меньшей мере к одному KIR в диапазоне от около 10^4 до около 10^{10} M^{-1} (например, около от 10^7 до около 10^9 M^{-1}). Термином иммунореакция здесь обычно описывается связывание анти-KIR антитела с KIR с константой диссоциации K_d менее около 10^{-4} M. Например, в частном случае настоящее изобретение предусматривает анти-KIR антитело, имеющее среднюю константу диссоциации (K_D) около 7×10^{-9} M или более по отношению к KIR2DL1 и KIR2DL2/3, определяемую с помощью скрининга поверхностным плазмонным резонансом (SPR) (например, при анализе с помощью SPR-анализирующего устройства BIAcore®). В более частном случае, настоящее изобретение предоставляет анти-KIR антитела, имеющие K_D около 2×10^{-9} M (например, около 0,1-4×10^{-9} M) или более для KIR2DL2/3 и около 11×10^{-9} M (например, около 7-15×10^{-9} M) или более для KIR2DL1.

Аффинность может быть определена с помощью любого из способов, описанных в настоящем документе, или их известных аналогов в уровне техники. Пример одного способа, который может быть использован для определения аффинности, описан в Scatchard analysis of Munson & Pollard, Anal. Biochem. 107:220 (1980). Аффинность связывания также может быть определена с помощью аналогичных способов (например, твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), радиоиммунологического анализа (RIA)) или анализа кинетики (например, BIAcore® анализа).

Анти-KIR антитела также или альтернативно могут быть охарактеризованы по показателям связывания KIR с константой диссоциации в концентрации меньше чем около 100 нМ, меньше чем около 50 нМ, меньше чем около 10 нМ, около 5 нМ или меньше, около 1 нМ или меньше, около 0,.5 нм или меньше, около 0,1 нМ, или меньше, около 0,01 нМ или меньше или даже около 0,001 нМ или меньше.

Авидность обозначает суммарную силу всех взаимодействий между связывающим белком и антигеном (например, суммарную силу взаимодействий между анти-KIR антителом и KIR). Под аффинностью понимается сила всех нековалентных взаимодействий между отдельным антигенсвязывающим сайтом антитела или другого связывающего пептида и отдельным эпитопом или антигенной детерминантой. Авидность, как правило, управляется тремя главными факторами: аффинностью, присущей связывающему белку в отношении эпитопа или антигенной детерминанты, с которыми он связывается; валентностью антитела или связывающего белка и антигена (например, анти-KIR антитело с валентностью 3, 4 или более будет, как правило, показывать более высокие уровни авидности к антигену, чем одновалентное антитело, особенно в случае наличия повторяющихся эпитопов в антигене); и/или геометрическим расположением взаимодействующих компонентов. Авидность обычно измеряется теми же самыми типами методов, которые используют для оценки аффинности.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает анти-KIR антитело, которое перекрёстно реагирует с рецепторами KIR двух или более биологических видов. Например, в одном аспекте настоящее изобретение предусматривает анти-KIR антитело, перекрёстно реагирующее с рецепторами KIR человека и обезьян циномолгус. В частном аспекте настоящее изобретение предусматривает анти-KIR антитело, перекрёстно реагирующее по меньшей мере с двумя рецепторами KIR человека и также связывающееся с NK-клетками обезьян циномолгус. Такое анти-KIR антитело может содержать последовательности из антитела NKVSF1, которое представляет подобный профиль перекрёстного реагирования. Подобные анти-KIR антитела при необходимости могут быть задействованы в анализах токсичности и других полезных исследованиях на обезьянах циномолгус.

Антитела, которые перекрёстно реагируют с разнообразными рецепторами KIR, могут быть использованы в комбинированных композициях и способах настоящего изобретения. Типичные профили перекрёстного реагирования таких антител включают антитела, перекрёстно реагирующие с рецепторами KIR2DL1 плюс 2DL2/3, 3DL1 плюс 3DL2, 2 DL1 (и 2DL2/3) плюс 2DS4 и 2DL1 (и 2DL2/3), но не 2DS4.

Так, например, способы или композиции настоящего изобретения могут содержать анти-KIR антитело, которое связывается с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и снижает или блокирует ингибирование цитотоксичности NK-клеток, опосредованной KIR, как описано, например, в WO 2005/003168.

Типичные анти-KIR антитела, полезные в комбинированных способах и композициях настоящего изобретения, включают анти-KIR антитела, содержащие V_L район, соответствующий V_L району анти-KIR антитела DF200 или содержащий в существенной степени подобный V_L район (почти полностью сходный и сохраняющий подобный связывающий профиль и аффинность) или сходный в высокой степени V_L домен/последовательность (например, по меньшей мере на около 90% идентичный или на 95% идентичный) с V_L последовательностью DF200. V_L последовательность DF200 показана в WO 2006/3179. Подобные анти-KIR антитела также могут быть альтернативно описаны по содержанию набора легких вариабельных CDR DF200 (также показано в WO 2006/3179). Такое антитело, как правило, будет также содержать либо V_H домен DF200, либо последовательность с высоким сходством (например, последовательность с высоким уровнем идентичности V_H домену DF200 или, в другом случае, в существенной степени сходную последовательность), либо, по меньшей мере, CDR тяжёлой вариабельной цепи DF200 (показаны в WO 2006/3179).

В другом иллюстративном аспекте комбинированная композиция или способ настоящего изобретения включает анти-KIR антитело, содержащее V_H и V_L последовательности, соответствующие V_L и V_H последовательностям антитела 1-7F9 (показано в WO 2006/3179) или последовательности с высоким уровнем сходства с ними (например, состоящие преимущественно из них) или по меньшей мере содержащие V_L и V_H CDR 1-7F9.

Конкуренция с перекрёстно реагирующими и/или нейтрализующими анти-KIR антителами.

В другом аспекте способы или композиции настоящего изобретения характеризуются наличием анти-KIR антитела, которое конкурирует с одним из этих антител или с одним из других анти-KIR антител, описанных в ссылках, включённых в настоящий документ (например, 1-7F9).

Антитела, конкурирующие с типичными анти-KIR антителами, такими как DF200, 1-7F9 и/или NKVSF1, могут быть идентифицированы с использованием известных инструментов скрининга. Несколько подобных инструментов регулярно используют и хорошо известны в уровне техники. (См., например, патент США № 5660827, который специально включён в настоящий документ посредством ссылки). Протоколы, основанные, например, на ИФА, радиоиммуноанализах, Вестерн-блоттинге и использовании BIAcore анализа, являются подходящими для использования в подобных исследованиях конкуренции.

Можно, например, предварительно смешать контрольное антитело (например, DF200, NKVSF1 или 1-7F9) с разными количествами исследуемого антитела (например, в соотношении около 1:1, 1:2, 1:10 или около 1:100) на некоторое время перед нанесением на образец KIR антигена. Альтернативно, контрольное антитело и разные количества исследуемого антитела могут быть просто добавлены по отдельности и смешаться в процессе воздействия на образец KIR антигена. Так как возможно отличать связанные антитела от несвязанных (например, с использованием методов разделения или отмывки для удаления несвязанных антител) и контрольное антитело от исследуемого антитела (например, путём использования видоспецифичных или изотип-специфичных вторичных антител или путём специфичного мечения контрольного антитела обнаруживаемой меткой), имеется возможность определять, снижает ли исследуемое антитело связывание контрольного антитела с различными KIR2DL антигенами, указывая, что исследуемое антитело распознаёт почти тот же самый эпитоп, что и контрольное. Связывание (меченого) контрольного антитела в присутствии абсолютно незначимого антитела (которое на связывает KIR) может служить показателем верхнего значения контрольного сигнала. Нижнее значение контрольного сигнала может быть получено путём инкубирования меченого контрольного антитела с тем же самым, но немеченным контрольным антителом, где будет происходить конкуренция и снижение связывания меченого антитела. В опытном образце существенное снижение реакционной способности меченого антитела в присутствии исследуемого антитела является показателем того, что исследуемое антитело распознаёт почти тот же самый эпитоп, т.е. конкурирует с меченым контрольным антителом. Например, любое исследуемое антитело, снижающее связывание контрольного антитела к одному или обоим KIR2DL1 и KIR2DL3 антигенам по меньшей мере на около 50%, снижающее по меньшей мере на около 60% или по меньшей мере на около 70%, что более предпочтительно (например, около 65-100%), при любом соотношении контрольного и исследуемого антитела в диапазоне около 1:1 или 1:10 и около 1:100, рассматривается как антитело, конкурирующее с контролем.

Конкуренцию также можно оценить с помощью, например, проточной цитометрии. В таком анализе клетки, несущие заданный KIR, могут быть вначале проинкубированы с контрольным антителом, а затем с исследуемым антителом, меченным флуорохромом или биотином. Антитело считается конкурирующим с контрольным антителом, если уровень связывания, полученный после преинкубации с достаточным для насыщения количеством контрольного антитела, составляет около 80%, предпочтительно около 50%, около 40% или менее (например, около 30%) от уровня связывания (измеренного с помощью флуоресценции) исследуемого антитела, полученного без преинкубации с контрольным антителом. Альтернативно, антитело считается конкурирующим с контрольным антителом, если уровень связывания, полученный с помощью меченого (флуорохромом или биотином) контрольного антитела на клетках, преинкубированных с достаточным для насыщения количеством исследуемого антитела, составляет около 80%, предпочтительно около 50%, около 40% или менее (например, около 30%) от уровня связывания,

полученного без преинкубации с исследуемым антителом.

Также может быть преимущественно использован одностадийный анализ конкуренции, в котором исследуемое антитело преадсорбируется и наносится в насыщающей концентрации на поверхность, на которой иммобилизован либо KIR2DL1, либо KIR2DL2/3, либо они вместе. Поверхностью для одностадийного анализа конкуренции предпочтительно является BIAcore микрочип (или другие среды, подходящие для анализа поверхностным плазмонным резонансом). Проводится измерение связывания контрольного антитела с поверхностью, покрытой KIR. Это связывание отдельно взятого контрольного антитела с KIR-содержащей поверхностью сравнивается со связыванием контрольного антитела в присутствии исследуемого антитела. Существенное снижение уровня связывания контрольного антитела с KIR2DL1 и KIR2DL2/3-содержащей поверхностью в присутствии исследуемого антитела указывает на то, что исследуемое антитело распознаёт почти тот же самый эпитоп, что и контрольное антитело, так что исследуемое антитело "конкурирует" с контрольным антителом.

Любое исследуемое антитело, снижающее уровень связывания контрольного антитела с обоими KIR2DL1 и KIR2DL2/3 антигенами по меньшей мере около на 20% или более, по меньшей мере около на 40%, по меньшей мере около на 50%, по меньшей мере около на 70% или более, может рассматриваться как антитело, конкурирующее с контрольным антителом. В лучшем случае такое исследуемое антитело будет снижать уровень связывания контрольного антитела, по меньшей мере, с каждым из KIR2DL1, 2 и 3 антигенов по меньшей мере около на 50% (например, по меньшей мере около на 60%, по меньшей мере около на 70% или более). Следует принять во внимание, что контрольное и исследуемое антитела могут быть взяты в обратном порядке, т.е. при анализе конкуренции контрольное антитело может быть связано с поверхностью вначале, а затем исследуемое антитело наносится на эту поверхность. Предпочтительно вначале наносить на KIR2DL1 и KIR2DL2/3-содержщую поверхность антитело, имеющее более высокую аффинность к KIR2DL1 и KIR2DL2/3, так как ожидается, что снижение уровня связывания, наблюдаемое для второго антитела (предполагая, что антитела конкурируют), будет сильнее. Дополнительные иллюстрации подобных анализов приведены здесь в качестве примеров и, например, в Saunal and Regenmortel, (1995), J. Immunol. Methods, 183:33-41, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

В другом аспекте способ или композиция настоящего изобретения характеризуются включением только тех антител, которые не являются перекрёстно реагирующими более чем с одним KIR. Например, для моноклональных антител, специфичных только к KIR2DL1, показано блокирование взаимодействий между KIR2DL1 и аллотипами HLA-Cw4, так же как и подобными аллотипами HLA-C, принадлежащими к той же группе, что и Cw4 (Moretta et al., J Exp. Med. 1993;1 78(2):597-604, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки). В другом примере моноклональные антитела против KIR2DL2/3 также описаны как блокирующие взаимодействия KIR2DL2/3 с аллотипами HLACw3 (и им подобными) (Moretta et al., выше). Антитело необязательно может быть выбрано из группы, состоящей из GL183 (KIR2DL2/3/S2-специфичные, доступные от Immunotech, France, и в Beckton Dickinson, USA); EB6 (KIR2DL1/s1-специфичные, доступные в Immunotech, France, и в Beckton Dickinson, USA).

Эпитопы.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение предусматривает анти-KIR антитела, направленные против конкретных антигенных районов и/или эпитопов, представленных на разных рецепторах KIR. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает, например, анти-KIR антитела, которые специфично связываются с KIR2DL1 внутри района, определяемого одним или более (или всеми) из аминокислотных остатков, расположенных в позициях 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 настоящее изобретение предусматривает анти-KIR антитела, которые специфически связываются с KIR2DL1 и KIR2DL2/3 в районе, определённом одним или более (или всеми) из аминокислотных остатков, расположенных в позициях 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 дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает анти-KIR антитела, которые связываются с KIR2DL1, но которые связываются с мутантным KIR2DL1, в котором аргинин в 131 положении представляет собой аланин, с существенно сниженной аффинностью (около 20% или менее, около 30% или менее, около 40% или менее, около 50% или менее, около 60% или менее, около 70% или менее от аффинности к KIR2DL1). В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает анти-KIR антитела, которые связываются с KIR2DL1, но которые связываются с мутантным KIR2DL1, в котором аргинин в 157 положении представляет собой аланин, с относительно сниженной аффинностью (около 20% или менее, около 30% или менее, около 40% или менее, около 50% или менее, около 60% или менее, около 70% или менее от аффинности, показанной для KIR2DL1). В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает анти-KIR антитела, которые связываются KIR2DL1 и которые связываются с мутантным KIR2DL1, в котором аргинин в 158 положении представляет собой аланин, с относительно сниженной аффинностью (около 20% или менее, около 30% или менее, около 40% или менее, около 50% или менее, около 60% или менее, около 70% или менее от аффинности, показанной для KIR2DL1).

Настоящее изобретение предусматривает анти-KIR антитела, которые связываются с аминокислотными остатками KIR2DL1 в позициях 131, 157 и 158.

Настоящее изобретение предусматривает анти-KIR антитела, связывающиеся с KIR2DS3(R131W), но не с KIR2DS3 дикого типа. В ещё одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены анти-KIR антитела, связывающиеся с KIR2DL1 и KIR2DL2/3, а также с KIR2DS4. В ещё одном аспекте в данном изобретении предусмотрены анти-KIR антитела, связывающиеся с обоими KIR2DL1 и KIR2DL2/3, но не с KIR2DS4.

Чтобы проиллюстрировать назначение последовательностей анти-KIR антитела в структуре и составе анти-KIR антител, здесь будут описаны примеры последовательностей анти-KIR антитела и варианты последовательностей антитела. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности вариабельных районов и CDR примеров представителей KIR антител DF200 и 1-7F9 также приведены в WO 2006/003179.

Примеры моноклональных анти-KIR антител включают в себя моноклональные антитела 1-7F9 и 1-4F1, которые имеют несколько преимуществ над остальными анти-KIR антителами. Например, 1-7F9 и 1-4F1 являются полностью человеческими, что снижает или минимизирует любой иммунный ответ против данного антитела, введённого субъекту. Более того, оба 1-7F9 и 1-4F1 являются подходящими изотипами для терапевтических анти-KIR антител (IgG4 и IgG2 соответственно), как описано ниже. 1-7F9 также более эффективен, чем мышиные моноклональные антитела EB6, GL183, DF200 и NKVSF1 (Pan2D) для индуцирования процесса уничтожения NK-клетками, экспрессирующими или KIR2DL1, 2 и/или 3. 1-7F9 связывается с KIR2DL1 и KIR2DL3 с константами диссоциации (K_d) 0,43 и 0,025 нМ соответственно, представляя более высокую аффинность для обоих антигенов, чем, например, DF200. Особо предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению по этой причине имеют те же самые или похожие антигенные специфичности, что и 1-7F9 и/или 1-4F1. Например, антитела, содержащие те же самые или похожие V_H и V_L районы, что и 1-7F9, могут иметь те же самые или похожие антигенсвязывающие и/или NK-стимулирующие свойства, что и 1-7F9; и антитела, содержащие те же самые или похожие V_H и V_L районы, что и 1-4F1, могут иметь те же самые или похожие антигенсвязывающие свойства, что и 1-4F1.

Антитело может содержать следующие аминокислотные последовательность V_L и/или V_H районов 1-7F9:

1-7A9 V_L район (SEQ ID NO 1)

EEVLTQSPVTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLEYDAS
NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWMYTFGQGTKLEIKRT

1-7F9 V_H район (SEQ ID NO: 2):

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSFYAISWVRQAPGQGLEWMGGF
IPIFGAANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARIPSGSYYYDYD
MDVWGQGTTVTVSS.

Аминокислотные последовательности V_L и V_H районов 1-4F1 представлены в SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно. В частном варианте аминокислотными остатками в положениях 3, 4, 9, 24, 32, 41, 47, 50, 55, 71 и 74 SEQ ID NO: 3 являются Q, L, S, R, A, G, L, D, E, F и A соответственно. В другом частном варианте аминокислотные остатки 3, 4, 9, 24, 32, 41, 47, 50, 55, 71 и 74 SEQ ID NO: 3 являются R, M, F, W, Y, A, F, Y, Q, Y и T соответственно.

Аминокислотные последовательности CDR 1-7F9 следующие:

аминокислотная последовательность CDR1 лёгкой цепи соответствует остаткам 24-34 SEQ ID NO: 1;

аминокислотная последовательность CDR2 лёгкой цепи соответствует остаткам 50-56 SEQ ID NO: 1;

аминокислотная последовательность CDR3 лёгкой цепи соответствует остаткам 89-97 SEQ ID NO: 1; аминокислотная последовательность CDR1 тяжёлой цепи соответствует остаткам 31-35 SEQ ID NO: 2;

аминокислотная последовательность CDR2 тяжёлой цепи соответствует остаткам 50-65 SEQ ID NO: 2; и

аминокислотная последовательность CDR3 тяжёлой цепи соответствует остаткам 99-112 SEQ ID NO: 2.

Аминокислотные последовательности CDR 1-4F1 были идентифицированы как следующие:

аминокислотная последовательность CDR1 лёгкой цепи соответствует остаткам 24-34 SEQ ID NO: 3;

аминокислотная последовательность CDR2 лёгкой цепи соответствует остаткам 50-56 SEQ ID NO: 3;

аминокислотная последовательность CDR3 лёгкой цепи соответствует остаткам 89-97 SEQ ID NO: 3

аминокислотная последовательность CDR1 тяжёлой цепи соответствует остаткам 31-35 SEQ ID NO: 4;

аминокислотная последовательность CDR2 тяжёлой цепи соответствует остаткам 50-66 SEQ ID NO: 4; и

аминокислотная последовательность CDR3 тяжёлой цепи соответствует остаткам 99-113

SEQ ID NO: 4.

Полные аминокислотные последовательности для лёгких и тяжёлых цепей 1-7F9 представлены в SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно.

Соответственно, на основе этой информации могут быть легко созданы дополнительные антитела, например, различных подклассов антител человека; фрагменты антител, производные антител и другие связывающие KIR пептиды путём, например, методов рекомбинации. Например, в одном аспекте настоящее изобретение предусматривает антитело, имеющее последовательности V_L и V_H, состоящие главным образом из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно, и/или антитело, имеющее последовательности V_L и V_H, состоящие главным образом из SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно. В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает антитело, содержащее CDR районы, состоящие главным образом из описанных выше V_H CDR1-3 и V_L CDR1-3 1-7F9 или 1-4F1 или из антитела, имеющего лёгкие и тяжёлые цепи, состоящие главным образом из лёгких и тяжёлых цепей 1-7F9, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает антитело, содержащее следующие CDR районы:

аминокислотная последовательность CDR1 лёгкой цепи соответствует остаткам около 24-34 SEQ ID NO: 1;

аминокислотная последовательность CDR2 лёгкой цепи соответствует остаткам около 50-56 SEQ ID NO: 1;

аминокислотная последовательность CDR3 лёгкой цепи соответствует остаткам около 89-97 SEQ ID NO: 1;

аминокислотная последовательность CDR1 тяжёлой цепи соответствует остаткам около 31-35 SEQ ID NO: 2;

аминокислотная последовательность CDR2 тяжёлой цепи соответствует остаткам около 50-65 SEQ ID NO: 2; и

аминокислотная последовательность CDR3 тяжёлой цепи соответствует остаткам около 99-112 SEQ ID NO: 2.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает антитело, содержащее следующие CDR районы:

аминокислотная последовательность CDR1 лёгкой цепи соответствует остаткам около 24-34 SEQ ID NO: 3;

аминокислотная последовательность CDR2 лёгкой цепи соответствует остаткам около 50-56 SEQ ID NO: 3;

аминокислотная последовательность CDR3 лёгкой цепи соответствует остаткам около 89-97 SEQ ID NO: 3;

аминокислотная последовательность CDR1 тяжёлой цепи соответствует остаткам около 31-35 SEQ ID NO: 4;

аминокислотная последовательность CDR2 тяжёлой цепи соответствует остаткам около 50-66 SEQ ID NO: 4;

и аминокислотная последовательность CDR3 тяжёлой цепи соответствует остаткам около 99-113 SEQ ID NO: 4.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает антитело, содержащее

аминокислотную последовательность CDR1 лёгкой цепи, состоящую по существу из остатков 24-34 SEQ ID NO: 1;

аминокислотную последовательность CDR2 лёгкой цепи, состоящую по существу из остатков 50-56 SEQ ID NO: 1;

аминокислотную последовательность CDR3 лёгкой цепи, состоящую по существу из остатков 89-97 SEQ ID NO: 1;

аминокислотную последовательность CDR1 тяжёлой цепи, состоящую по существу из остатков 31-35 SEQ ID NO: 2;

аминокислотную последовательность CDR2 тяжёлой цепи, состоящую по существу из остатков 50-65 SEQ ID NO: 2;

и аминокислотную последовательность CDR3 тяжёлой цепи, состоящую по существу из остатков 99-112 SEQ ID NO: 2.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает антитело, содержащее следующие CDR районы:

аминокислотная последовательность CDR1 лёгкой цепи состоит по существу из остатков 24-34 SEQ ID NO: 3;

аминокислотная последовательность CDR2 лёгкой цепи состоит по существу из остатков 50-56 SEQ ID NO: 3;

аминокислотная последовательность CDR3 лёгкой цепи состоит по существу из остатков 89-97 EQ ID NO: 3;

аминокислотная последовательность CDR1 тяжёлой цепи состоит по существу из остатков 31-35 SEQ ID NO: 4;

аминокислотная последовательность CDR2 тяжёлой цепи состоит по существу из остатков 50-66 SEQ ID NO: 4; и

аминокислотная последовательность CDR3 тяжёлой цепи состоит по существу из остатков 99-113 SEQ ID NO: 4.

Настоящее изобретение также охватывает применение анти-KIR антитела, фрагмента антитела или производного антитела, или KIR-связывающего полипептида, содержащего по меньшей мере одну вариантную аминокислотную последовательность, по существу идентичную последовательности V_H или V_L 1-7F9 или 1-4F1 или их CDR-районам. Вариантная аминокислотная последовательность может содержать состоять по существу из аминокислотной последовательности, которая идентична CDR, V_H или V_L району 1-7F9 или 1-4F1 или последовательности тяжёлой или лёгкой цепи по меньшей мере на около 50, 80, 90, 95, 98 или 99% (например, около 50-99%, около 65-99% или около 85-99%). Антитело может содержать, например, лёгкие и тяжёлые цепи 1-7F9, каждая из которых имеет последовательность, которые идентичны SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно, по меньшей мере, на около 50, 80, 90, 95, 98 или 99%. Вариантная аминокислотная последовательность может содержать, например, 1, 2 или 3 CDR, которые содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, которые идентичны CDR 1-7F9 или 1-4F1, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95%. Вариантная аминокислотная последовательность может также или альтернативно содержать 1, 2 или 3 CDR, которые содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, идентичных CDR 1-7F9 или 1-4F1 по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95%.

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение предусматривает человеческое антитело, содержащее аминокислотную последовательность CDR1 лёгкой цепи, идентичную остаткам 24-34 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95%; аминокислотную последовательность CDR2 лёгкой цепи, идентичную остаткам 50-56 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95%; аминокислотную последовательность CDR3 лёгкой цепи, идентичную остаткам 89-97 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95%; аминокислотную последовательность CDR1 тяжёлой цепи, идентичную остаткам 31-35 SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95%; аминокислотную последовательность CDR2 тяжёлой цепи, идентичную остаткам 50-65 SEQ ID NO: 2 или остаткам 50-66 SEQ ID NO: 4 по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95%; и аминокислотную последовательность CDR3 тяжёлой цепи, идентичную остаткам 99-112 SEQ ID NO: 2 или остаткам 99-113 SEQ ID NO: 4 по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95%. Основные свойства полученных из 1-7F9- или 1-4F1 KIR-связывающих аминокислотных последовательностей, которые сохраняются в таких вариантных аминокислотных последовательностях, желательно включают специфичность и/или авидность последовательности 1-7F9 или 1-4F1 к одному или более рецепторам KIR и могут также или альтернативно включать способность 1-7F9 к блокировке взаимодействия KIR/HLA-C и стимуляции литической активности NK-клеток.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает применение анти-KIR антитела, фрагмента антитела или производного антитела или KIR-связывающего полипептида, содержащего KIR-связывающую аминокислотную последовательность, которая отличается от KIR-связывающей последовательности 1-7F9 или 1-4F1 одним или более аминокислотными остатками (например, по меньшей мере 2, 3, 5, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 50 или более аминокислотными остатками) в виде вставок, делеций и/или замен оснований. Такой вариант KIR-связывающей последовательности предоставляет отличающейся последовательности большую аффинность; большую или другую специфичность; меньшую иммуногенность (в показателях иммунного ответа на данную последовательность); большую стабильность in vivo и/или другие преимущественные свойства по существу над идентичной аминокислотной последовательностью, содержащей нативную последовательность 1-7F9 или 1-4F1. Применимые вариации последовательности описаны ниже в настоящем документе. KIR-связывающая часть анти-KIR антитела, фрагмента антитела или производного антитела, или KIR-связывающего полипептида может также содержать любое подходящее количество не аминокислотных компонентов или заместителей, таких как не аминокислотных органических частей, которые облегчают связывание KIR и/или предоставляют другие преимущественные физико-химические или иммунологические свойства.

Как уже упоминалось, применимые варианты последовательности антигенсвязывающего антитела, такие как последовательности анти-KIR антитела, могут быть включены в антитела настоящего изобретения. Вариации в большинстве типов последовательностей антител могут быть приемлемы. Так, напри-

мер, анти-KIR антитело может содержать вариантные константные последовательности и вариантные каркасные последовательности.

Настоящее изобретение предусматривает анти-KIR антитело, которое содержит одну или более вариантных последовательностей CDR (т.е. последовательность CDR, которая отличается от подобной последовательности CDR дикого типа на одну или более аминокислотных вставок, делеций и/или замен, которые воздействуют на биологические и/или физико-химические свойства последовательности, по отношению к её близкородственной последовательности дикого типа). См., например, методы, описанные в WO 2006/072625. Варианты последовательностей CDR, V_H и V_L могут демонстрировать любой приемлемый уровень идентичности к одной или более "родительским" последовательностям CDR, V_H или V_L соответственно, таким как последовательности CDR, V_H и V_L моноклонального анти-KIR антитела DF200 и/или моноклонального анти-KIR антитела NKVSF1. Как правило, вариантная последовательность, которая связывается по существу с идентичным антиген-детерминирующим районом, что и "родительская", сохраняет по меньшей мере около 40% идентичности аминокислотной последовательности по отношению к "родительской" последовательности, например, около 50% или более, около 60% или более, около 70% или более, около 75% или более, около 80% или более, около 85% или более, около 90% или более или по меньшей мере около 95% (например, около 45-99%, около 55-99% или около 65-99%) идентичности по отношению к "родительской" последовательности. Однако в некоторых случаях, особенно учитывая последовательности CDR, нацеленные, по существу, на идентичный эпитоп, даже варианты с меньшими уровнями идентичности могут быть приемлемы.

Варианты последовательностей CDR, V_H и V_L, которые связываются с разными антиген-детерминирующими районами или с разным набором (или "профилем") антиген-детерминирующих районов, также могут быть созданы с помощью любых методов, описанных в настоящем документе (рациональное конструирование, мутагенез, направленная эволюция). В подобных случаях можно ожидать существенно более низкие уровни идентичности аминокислотной последовательности по отношению к "родительской" последовательности. Например, в случае варианта CDR-L1, CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3 с профилем связывания эпитопа, отличного от "родительского", у вариантов, связывающихся с рецепторами NKCAMR, такими как KIR, может быть продемонстрирована всего лишь около 20-30% идентичность аминокислотной последовательности по отношению к "родительской" последовательности CDR.

Дальнейшие варианты последовательностей анти-KIR антитела, включая специфические формулы последовательностей CDR и вариабельного района, представлены в WO 2006/072625, раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Как правило, варианты отличаются от "родительской" последовательности главным образом за счёт консервативных замен; например, по меньшей мере около 35%, около 50% или более, около 60% или более, около 70% или более, около 75% или более, около 80% или более, около 85% или более около 90% или более, около 95% или более (например, около 65-99%) замен в данном варианте являются консервативными заменами аминокислот. В контексте настоящего изобретения консервативные замены могут быть определены как замены внутри классов аминокислот, отображённых в табл. 4, 5 или 6 WO 2006/072625 (Novo Nordisk AS и Innate Pharma SA). WO 2006/072625 также описывает дополнительные группировки консервативных замен; внесение существенных изменений в функцию путём выбора замен, которые менее консервативны; принципы, полезные в разработке и выборе пептидных вариантов; консервативность в показателях свойств гидрофобности/гидрофильности; сохранение структуры вариантного пептида, почти полностью идентичной структуре "родительского" пептида, включая методы для оценки сходства пептидов в показателях консервативных замен, гидрофобных свойств, консервативности массы, строения или сходства вторичной структуры, как определяется с использованием программы BLAST; другие показатели отличия/дивергенции между "родительской" и вариантной последовательностью, которые могут быть приемлемы; преимущественные изменения последовательности в районах CDR; вариации последовательности, приводящие к изменению гликозилирования; вставки гипервариабельных районов с целью создания вариантного антитела и в более общем смысле вариантов CDR.

Идентичность в контексте аминокислотных последовательностей в настоящем изобретении может быть определена любым подходящим методом, обычно выравниванием Нидлмана-Вунша (см. Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. (1970), 48:443-453), таким как предоставляется посредством анализа с помощью ALIGN 2.0 с использованием матрицы замены BLOSUM 50 со штрафом за внесение делеции -12 и штрафом за удлинение делеции -2 (см. Myers and Miller, CABIOS (1989), 4:11-17 для обсуждения общих методов выравнивания, включённых в программу ALIGN). Копия программы ALIGN 2.0 доступна, например, через San Diego Supercomputer (SDSC) Biology Workbench. Поскольку выравнивание Нидлмана-Вунша предусматривает полное или глобальное измерение идентичности между двумя последовательностями, следует отметить, что целевые последовательности, которые могут быть частями или субпоследовательностями более длинных последовательностей пептида, могут быть использованы в форме, аналогичной полным последовательностям, или, альтернативно, для оценки сходства между субпоследовательностями могут быть использованы значения локального выравнивания, как, например, определяется выравниванием Смита-Уолтермана (J. Mol. Biol. (1981), 147:195-197), которое может быть

получено через доступные программы (другие способы локального выравнивания, которые могут подходить для анализа идентичности, включают программы, применяющие эвристические алгоритмы локального выравнивания, такие как программы FastA и BLAST). Дальнейшие сходные способы оценки идентичности описаны, например, в международной патентной заявке WO 2003/048185. Алгоритм Готоха, который стремится превзойти алгоритм Нидлмана-Вунша, альтернативно может быть использован для общего выравнивания последовательностей. См., например, Gotoh, J. Mol. Biol. 162:705-708 (1982).

Соединения, включая антитела, ингибирующие KIR2DL1, 2 и/или 3 полипептид, могут быть способны усиливать уничтожение Т-клеток, которые могут активно способствовать развитию воспаления, что делает эти соединения, включая антитела, подходящими для использования как в случаях острого, так и хронического воспаления, так же как и для использования в комбинации со вторым терапевтическим агентом, используемым при воспалении. В частности, второй терапевтический агент снижает воспаление и включает, например, агенты, используемые в хронических и острых случаях, такие как модифицирующие заболевание антиревматические препараты (DMARD), такие как анти-TNFα и MTX, используемые в случае ревматоидного артрита и в других случаях, где используют подобные препараты.

Поскольку механизмы, стимулирующие воспаление, в частности острое и хроническое воспаление, часто считаются избыточно устойчивыми, антитела настоящего изобретения будут особенно полезны для использования в комбинации с агентами, которые влияют на механизм воспаления по-другому, чем в виде прямого уничтожения (например, посредством ADCC) Т-клеток, но имеют сходное биологическое предназначение, такое как снижение синтеза или действия провоспалительных цитокинов, особенно снижение или ингибирование TNFα.

Синтез антител.

Моноклональные антитела могут быть получены с использованием способа гибридомы, впервые описанного в Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), или другими хорошо известными способами, разработанными впоследствии. (См., например, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pages 59-103 (Academic Press, 1986)). Гибридомы и другие слитые клетки могут быть получены путём химического слияния, электрического слияния или любым другим приемлемым методом, с использованием любых подходящих типов миелом, гетеромиелом, лимфобластоидных клеток, плазмоцитом или подобных иммортализованных клеток и любым подходящим типом клеток, экспрессирующих антитело.

Трансформированные иммортализованные В-клетки также могут быть использованы для получения антител. Трансформированные В-клетки могут быть получены с помощью стандартных методов, таких как трансформация вирусом Эпштейна-Барра 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, pages 19-33.). Так, стабильные и/или иммортализованные клетки и клеточные линии, экспрессирующие анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело, являются ещё одной особенностью настоящего изобретения. Этап способа для получения анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител может включать, например, этап получения иммортализованных В-клеток, продуцирующих антитело, которые слиты с подходящими партнёрами для получения анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела (антител) или для которых выполнено секвенирование и выявлены последовательности, продуцирующие рекомбинантные анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела.

Клеточные линии, доступные в качестве хозяев для экспрессии рекомбинантных белков, хорошо известны в уровне техники и включают множество иммортализованных клеточных линий, доступных из американской коллекции типовых культур (ATCC). Они включают среди прочего клетки яичника китайского хомячка (CHO), NS0, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почки детенышей хомячка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549 и несколько других клеточных линий. Другие клеточные линии, которые могут быть использованы, - это клеточные линии насекомых, такие как клетки Sf9. Когда нуклеиновые кислоты (или векторы, содержащие нуклеиновые кислоты), кодирующие гены антитела, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, антитела могут быть получены путём культивирования клеток-хозяев в течение периода, достаточного для эффективной экспрессии антитела в клетках-хозяевах или более предпочтительно для секреции антитела в культуральную среду, с использованием стандартных способов очистки белка. Антитела также могут быть выделены из лизатов клеток-хозяев, когда они экспрессированы напрямую, без сигналов секреции.

Очистка антител из клеточных культур, клеточных лизатов и трансгенных животных или полученных из них биологических материалов (например, из асцитной жидкости трансгенных животных, продуцирующих антитела) может быть осуществлена путём применения любого количества подходящих методов, известных в уровне техники, включая, например, иммуноаффинную очистку на колонке, преципитацию сульфатом, хроматофокусирование, препаративный SDS-PAGE и т.п.

Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела также могут быть получены в бактериальных клетках и эукариотических одноклеточных организмах, таких как дрожжи. У полученных в бактериальных клетках антител отсутствует нормальное гликозилирование, и, соответственно, они могут быть дефектными по функциям ADCC и другим аспектам иммунного ответа, которые в противном случае могут быть свойст-

венны, по существу, идентичным антителам, полученным в клетках млекопитающих и/или в животных.

Могут быть использованы подходящие методы для очистки, скрининга и селекции антител, включая те, что описаны в WO 2006/072625. Скрининг и селекция анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител могут быть выполнены с помощью любого подходящего метода или комбинации методов. Например, множество форматов иммуноанализа может быть использовано для селекции антител, которые селективно связываются с конкретным белком, его вариантом или фрагментом. Например, твердофазный ИФА регулярно используют для отбора антител, селективно иммунореактивных с белком, вариантом белка или его фрагментом. См. Harlow and Lane, выше. Аффинность моноклонального антитела может быть определена, например, с помощью анализа Скэтчарда из Munson et al., Anal. Biochem, 107:220 (1980).

У анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела обычно проверяют наличие способности к модуляции активности NK-клеток, например, ингибировать опосредованные KIR2DL1, 2 и/или 3 сигналы, стимулировать активацию NK-клеток через сигналы, передающиеся NK активирующим рецептором. Было разработано несколько типов анализа NK-клеток, которые могут быть полезными в случаях, включающих, например, скрининг проточной цитометрией. См., например, McGinnes, et al. (1984), J. Immunol. Methods, 80:70-85. Способы, имеющие отношение к культивированию NK-клеток, оценке NK-клеток и т.п., хорошо известны в уровне техники. См., например, Campbell and Colonna, Natural Killer Cell Protocols (Methods in Molecular Biology Series, vol. 121) (2000).

В отношении анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител, нейтрализующая активность NK-клеток может быть продемонстрирована способностью анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела восстанавливать лизис клеток мишеней KIR2DL1, 2 и/или 3-позитивными NK-клетками. Модуляция NK-клеток (например, ингибирование KIR), связанной с анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителом, также может быть оценена с помощью основанных на клетках различных анализах цитотоксичности. Анализ с перенаправленной киллинговой активностью NK-клеток является одной из экспериментальных моделей для оценки способности рецепторов NK-клеток индуцировать цитотоксичность. NK-клетки, покрытые антителами, специфичными к рецепторам-кандидатам, оцениваются на способность к уничтожению клеток-мишеней, которые экспрессируют Fc рецептор, с которым связывается антитело. В другом варианте модуляция активности NK-клетки, связанной с анти-KIR антителами, может быть оценена в анализе высвобождения цитокинов. Другие биологические активности, ассоциированные с различными анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителами, также могут быть использованы для оценки анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител.

Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела, как правило, представлены и используются по существу в чистой форме. По существу чистая молекула - это молекула преобладающего вида в смеси, где она находится, по отношению к классу молекул, к которому она принадлежит (например, по существу чистое антитело является преобладающим видом белка в смеси, где оно находится). По существу чистый вид молекул составляет по массе по меньшей мере около 50% от данного типа молекул в смеси и обычно составляет по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85% по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или более высокий процентный показатель вида молекул в смеси по массе. В большинстве случаев смесь, содержащая анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело, будет демонстрировать по меньшей мере около 98, 98 или 99% гомогенности по анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителу среди всех присутствующих в смеси видов пептидов или, по меньшей мере, с учётом существенно активных видов пептидов в контексте планируемого применения. Например, стабилизирующий/буферный пептид, такой как альбумин, может быть специально добавлен в конечную фармацевтическую композицию без помех для активности анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител и соответственно может быть исключён из подобных расчётов чистоты препарата. Присутствие примесей, которые не препятствуют основной активности, также может быть приемлемо в случае по существу чистой смеси. Чистота может быть измерена способами, подходящими для данного соединения (например, способами хроматографии; электрофорезом в агарозном или полиакриламидном геле; HPLC и т.д.).

Понятие "выделенная молекула" относится к молекуле, которая не ассоциирована с заметными уровнями (например, более чем около 1 %, более чем около 2%, более чем около 3% или более чем около 5%) посторонних нежелательных биологических молекул, таких как антитела, не являющиеся анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителами, содержащихся внутри клетки, в клеточной культуре, химических средах или в животном, в котором анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело продуцируется. К выделенной молекуле также относят любую молекулу, которая достигла подобной степени очистки искусственным способом (автоматическим, ручным или обоими) в течение значительного промежутка времени (например, по меньшей мере около 10 мин, по меньшей мере около 20 мин, по меньшей мере около 1 ч или дольше). Во многих из разнообразных композиций, предусмотренных в настоящем изобретении, таких как композиции, содержащие один или более фармацевтически приемлемый носитель, анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело может быть представлено в относительно небольших количествах относительно общего числа молекул в данной композиции (например, в случае, если композиция содержит большое количество фармацевтически приемлемого носителя, стабилизатора, и/или консерванта). В некоторых случаях в подобную композицию с предварительно очищенным анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителом могут быть включены дополнительные пептиды, такие как BSA. Однако предусматривается, что подобные добавочные компоненты композиции являются приемлемыми для предполагаемого применения анти-KIR2DL1,

2 и/или 3 антитела, подобная композиция по-прежнему может быть описана, как содержащая выделенное анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело. Другими словами, термин "выделенный" не предполагает исключения искусственных или синтетических смесей с другими соединениями или материалами, которые могут составлять часть фармацевтически приемлемого препарата.

Фармацевтически приемлемые носители.

Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело может быть комбинировано с одним или более носителями (растворителями, вспомогательными веществами и т.п.) и/или адъювантами, подходящими для одного или более предполагаемых путей введения, чтобы предусмотреть композицию, которая является фармацевтически приемлемой. Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела могут быть, например, смешаны с лактозой, сахарозой, порошками (например, с порошком крахмала), эфирами целлюлозы и насыщенных органических кислот, стеариновой кислотой, тальком, стеаратом магния, оксидом магния, натриевыми и кальциевыми солями фосфорной и серной кислот, гуммиарабиком, желатином, альгинатом натрия, поливинилпирролиидином и/или поливиниловым спиртом и, необязательно, в дальнейшем таблетированы или включены в желатиновую капсулу для обычного введения. Альтернативно, анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело может быть растворено в солевом растворе, воде, полиэтиленгликоле, пропиленгликоле, коллоидных растворах карбоксиметилцеллюлозы, этаноле, кукурузном масле, арахисовом масле, хлопковом масле, сезамовом масле, трагакантовой камеди и/или в различных буферах. Другие носители, адъюванты и способы введения хорошо известны в уровне фармацевтической техники. Носитель или растворитель может содержать вещество для временной задержки, такое как моностеарат глицерола или дистеарат глицерола отдельно или с воском или другими функционально сходными материалами. Фармацевтически приемлемые носители включают любые и все возможные подходящие растворители, дисперсионные среды, оболочки, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и т.п., которые физиологически совместимы с анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителом. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают воду, солевые растворы, солевые растворы с фосфатным буфером, декстрозу, глицерол, этанол и т.п., как и комбинации любых из них. Во многих случаях может быть желательным включение в подобную композицию изотонических агентов, например сахаров, полиспиртов, таких как маннитол, сорбитол, или хлорида натрия. Фармацевтически приемлемые вещества, такие как смачивающие агенты или минимальные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие агенты или эмульсифицирующие агенты, консерванты или буферные растворы, могут в соответствии с желанием увеличить срок хранения или эффективность анти-KIR антитела, соответствующей композиции или комбинации. Пригодность носителей и других компонентов фармацевтических композиций может быть определена на основе отсутствия существенного негативного влияния на желаемые биологические свойства данного антитела.

Композиции, содержащие анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело, близкородственные им композиции и комбинации согласно настоящему изобретению могут быть представлены в различных приемлемых формах. Такие формы включают, например, жидкую, полутвёрдую и твёрдую лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекции и инфузии), дисперсии или суспензии, эмульсии, микроэмульсии, таблетки, капсулы, 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. Дальнейшие описания композиций, солей можно найти в WO 2006/072625.

Обычно композиции в форме растворов для инъекции или инфузии, так же как и сходные с ними композиции, используемые для пассивной иммунизации людей, используют для доставки анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител настоящего изобретения. Обычным способом доставки композиций, содержащих анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело, является парентеральное введение (например, внутривенное, подкожное, интраперитонеальное и/или внутримышечное введение). В одном аспекте анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело вводят пациенту путём внутривенной инфузии или инъекции.

Композиция для фармацевтического применения также может включать различные растворители, наполнители, соли, буферные растворы, детергенты (например, неионный детергент, такой как Твин-80), стабилизаторы (например, аминокислоты, очищенные от сахаров или белков), консерванты, фиксаторы ткани, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для введения в состав композиции для фармацевтического применения. Примеры подходящих компонентов описаны, например, в Berge et al., J. Pharm. Sci., 6661, 1-19 (1977); Wang and Hanson, J. Parenteral. Sci. Tech: 42, S4-S6 (1988); патенты США № 6165779 и 6225289. Подобная фармацевтическая композиция также может включать консерванты, антиоксиданты или другие добавки, известные специалистам в данной области техники. Дополнительные фармацевтически приемлемые носители известны в уровне техники. См., например, ссылки в WO 2006/072625.

Полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Настоящее изобретение предусматривает полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и ICIR2DL3 и композиции, содержащие соединения, ингибирующие подобные полипептиды, для использования при лечении или профилактики аутоиммунных и воспалительных нарушений. Примеры полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 представлены в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11,

12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, см. табл. 1.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут быть модифицированы с использованием стандартных методов молекулярной биологии, что приводит к появлению вариантных полипептидов, содержащих по меньшей мере один KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, включающий делеции, вставки и замены, но не ограничиваясь ими, в аминокислотной последовательности, которая сохраняет специфическую антигенность KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 (например, полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 связываются анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антителом). Кроме того, вариантные полипептиды, содержащие по меньшей мере один полипептид KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, также могут сохранять антигенность полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 (например, рост специфического иммунного ответа против полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и вариантного полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 соответственно, после иммунизации субъекта). Полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут быть соединены с фармацевтическим носителем для производства антигенной композиции для использования в качестве "раковой вакцины" (например, фармацевтическая композиция, вызывающая специфический иммунный ответ против KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, и 24), что приводит к получению анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела после иммунизации субъекта).

Полипептидные производные и аналоги.

Следует принять во внимание, что описанные здесь полипептиды могут быть продуктами деградации, синтетическими пептидами или рекомбинантными пептидами, так же как и псевдопептидами, пептоидами и полупептоидами (например, аналогами пептидов, которые могут иметь, например, модификации, стабилизирующие пептиды в смесях или облегчающие их проникновение в клетки).

Модификации описанных здесь полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 включают N-концевую модификацию, C-концевую модификацию, модификацию пептидной связи (например, CH_2-NH, CH_2-S, CH_2-S=O, O=C-NH, CH_2-O, CH_2-CH_2, S=C-NH, CH=CH или CF=CH), модификацию главной цепи и модификацию аминокислотных остатков, но не ограничиваются ими. Способы получения псевдопептидных соединений хорошо известны в уровне техники. Martin, (2010), Quantitative Drug Design: A Critical Introduction [2nd Ed.] CRC Press.

Пептидные связи (-CO-NH-) внутри пептида могут быть замещены, например, N-метилированными связями (-N(CH_3)-CO-), эфирными связями (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-), кетометиленовыми связями (-CO-CH_2-), α-азасвязями (-NH-N(R)-CO-), где R-алкил, например метил, карбосвязями (-CH_2-NH-), гидроксиметиленовыми связями (-CH(OH)-CH_2-), тиоамидными связями (-CS-NH-), алкеновыми двойными связями (-CH=CH-), обратными амидными связями (-NH-CO-), пептидными производными (-N(R)-CH_2-CO-), где R - "нормальная" боковая цепь, в природном виде представленная на атоме углерода. Эти модификации могут встречаться с любой из связей пептидной цепи и даже с несколькими (2-3) одновременно.

Природные ароматические аминокислоты триптофан, тирозин и фенилаланин могут быть заменены синтетической неприродной аминокислотой, такой как фенилглицин, TIC, нафтилаланин (Nol), производные фенилаланина с метилированным кольцом, галогенированные производные фенилаланина или ортометилтирозин. В дополнение к упомянутому выше, полипептиды настоящего изобретения также могут включать одну или более модифицированную аминокислоту или один или более неаминокислотный мономер (например, жирные кислоты, сложные углеводородные соединения), например гидроксипролин, фосфосерин и фосфотреонин; и другие нестандартные аминокислоты, включая 2-аминоадипиновую кислоту, гидроксилизин, изодесмозин, норвалин, норлейцин и орнитин, но не ограничиваясь ими. Более того, термин "аминокислота" относится и к D-, и к L-аминокислотам.

Поскольку полипептиды настоящего изобретения предпочтительно используют в клинической медицине, что требует присутствия данных полипептидов в растворимой форме, полипептиды настоящего изобретения могут содержать одну или более неприродных аминокислот или природных полярных аминокислот, включая, но не ограничиваясь, серин и треонин, которые способны увеличивать растворимость пептида за счёт своей боковой цепи, содержащей гидроксильные группы.

Полипептиды настоящего изобретения могут быть в линейной форме.

Описанные здесь полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут быть очищены из клеток, которые были изменены, чтобы их экспрессировать (например, рекомбинантные). Последовательности ДНК, кодирующие полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут быть встроены в экспрессионный вектор и затем трансформированы (или трансфицированы) в подходящую клетку-хозяина и/или экспрессированы в трансгенном животном. Данные полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 (например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24), экспрессированные таким образом, могут быть впоследствии выделены с помощью способов, хорошо известных в уровне техники. См., например, Maniatis, et al. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3rd Ed.], Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Данные полипептиды настоящего изобретения могут быть синтезированы биохимическим путём, таким как с использованием стандартных твердофазных методов. Эти способы включают исключитель-

ный твердофазный синтез, способы частичного твердофазного синтеза, конденсацию фрагментов, классический синтез в растворе. Эти способы предпочтительно используют, когда пептид относительно короткий (т.е. 10 кДа) и/или когда он не может быть произведён с использованием рекомбинантных методов (т.е. не кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты), и, следовательно, в таких случаях применяют различные химические методы. Процедуры твердофазного синтеза пептида хорошо известны в уровне техники и подробно описаны в Stewart (1984), Solid Phase Peptide Syntheses [2nd Ed.] Pierce Chemical Company and Benoiton (2005), Chemistry of Peptide Synthesis CRC Press. Синтетические пептиды могут быть очищены препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией, и их состав может быть подтверждён с помощью секвенирования белков. См. Creighton (1992) [2nd Ed.], Proteins, Structures and Molecular Principles W.H. Freeman and Company; Aguilar (2004) [Ed.], HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols Humana Press; Simpson (2002) Protein Sequencing Protocols [2nd Ed.], Humana Press.

В случаях, где желательно получить большие количества полипептидов настоящего изобретения, полипептиды настоящего изобретения могут быть созданы с использованием рекомбинантных методов, таких как описаны Invitrogen (2002), "Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVs) and Insect Culture Techniques", Instruction Manual; Hatti-Kaul and Mattiasson (2003) [Eds], Isolation and Purification of Proteins; Ahmed (2004), Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification and Characterization CRC Press. Дополнительно, рекомбинантные методы описаны, например, в Bitter, et al. (1987), Methods in Enzymol. 153:516-544, Studier, et al. (1990), Methods in Enzymol. 185: 60-89, Brisson, et al. (1984), Nature, 310:511-514, Takamatsu, et al. (1987), EMBO J. 6:307- 311, Coruzzi, et al. (1984), EMBO J. 3:1671-1680 и Brogli, et al. (1984), Science, 224:838-843, Gurley, et al. (1986), Mol. Cell. Biol. 6:559-565 и Weissbach & Weissbach (1988). Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pages 421-463.

Варианты полипептидных последовательностей.

Для любой последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24 может быть достигнута дальнейшая характеристика или оптимизация путём либо добавления, либо удаления аминокислотных остатков, чтобы создавать более длинные или короткие пептиды и может быть проведен анализ полученных пептидов и последовательностей в отношении более длинных или коротких сначала и с конца антигена. Связывание этого подхода синтеза новых мишеней-кандидатов с анализом эффективности молекул антигена, основанном на этих последовательностях, в анализе иммуногенности, известном в уровне техники или как описано здесь, может привести к дальнейшей манипуляции с антигеном. Более того, подобные оптимизированные последовательности могут быть обусловлены, например, инсерцией, делециями или другими мутациями, как известно в уровне техники или обсуждено здесь, для дальнейшей оптимизации KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 (например, увеличением стабильности в сыворотке, или времени полужизни в кровотоке, увеличением термостабильности, облегчением доставки, усилением иммуногенности, увеличением растворимости, направлением в определённое место in vivo или в определённый тип клеток).

Описанные здесь полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут содержать консервативные замены (т.е. замена одной или более аминокислот сходными аминокислотами). Например, к консервативной замене относится замена одной аминокислоты на другую внутри одного общего класса, например кислой аминокислоты на другую кислую аминокислоту, основной аминокислоты на другую основную аминокислоту или нейтральной аминокислоты на другую нейтральную аминокислоту.

Последовательности полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут иметь по меньшей мере около 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% гомологии с одной или более аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24. В настоящем изобретении предпочтительно рассматриваются полипептидные последовательности, имеющие по меньшей мере около 95% гомологии, более предпочтительно по меньшей мере около 98% гомологии и ещё более предпочтительно по меньшей мере около 99% гомологии с любой одной или более полипептидными последовательностями из KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, имеющими соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24. Способы для определения гомологии между аминокислотными последовательностями, так же как и между нуклеотидными последовательностями хорошо известны обычным специалистам в данной области техники. См., например, Nedelkov & Nelson (2006), New and Emerging Proteomic Techniques Humana Press.

Таким образом, полипептид KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может иметь по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% гомологии последовательности с одной из определённых последовательностей полипептида. Например, полипептид KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может иметь по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% гомологии с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 7, 8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24.

Термин "гомология или идентичность" понимается как обозначение количества совпадающих аминокислот (идентичность) с аминокислотами в другом белке, выраженное в процентах. Идентичность

предпочтительно определяется путём сравнения данной последовательности с другими белками с использованием компьютерных программ. Если последовательности, которые сравниваются между собой, разной длины, идентичность должна определяться таким путём, где количество аминокислот, по которым короткая последовательность совпадает с более длинной последовательностью, определяет процент идентичности. Идентичность может быть легко определена посредством известных компьютерных программ, которые находятся в открытом доступе, такими как, например, ClustalW. Thompson, et al. (1994), Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680. ClustalW находится в открытом доступе в European Molecular Biology Laboratory и может быть загружена с разных страниц интернета, среди которых IGBMC (Institut de Gendtique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire) и EBI, и все отображаемые на других сайтах EBI страницы в интернете (European Bioinformatics Institute). Если для определения идентичности, например, между белком сравнения по настоящему изобретению и другими белками используют компьютерную программу ClustalW версии 1.8, должны быть установлены следующие параметры: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAPOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP. См. также набор инструментов European Bioinformatics Institute (EBI), который доступен онлайн, и Smith (2002) Protein Sequencing Protocols [2nd Ed.], Humana Press.

Одна возможность поиска сходных последовательностей заключается в осуществлении поиска в базе данных. В этом случае одна или более последовательность может быть введена как запрос. Затем эта последовательность сравнивается с последовательностями, имеющимися в выбранных базах данных, с использованием статистических компьютерных программ. Такие запросы базы данных (blast-запросы) известны специалистам и могут быть выполнены в разных источниках. Если, например, такой запрос базы данных выполнен в NCBI (National Center for Biotechnology Information), должны быть использованы стандартные настройки для относительного сравнения. Для сравнения белковых последовательностей (blastp) эти настройки выглядят следующим образом: Limit entrez = not activated; Filter = low complexity activated; Expect value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence =11, Extension = 1. В результате обработки такого запроса среди других параметров определяется степень идентичности между последовательностью, введённой как запрос, и сходными последовательностями, найденными в базах данных. Полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 содержат соответствующие функциональные фрагменты. "Функциональный фрагмент" указанного полипептида включает фрагмент гена или кДНК, кодирующей указанный KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, фрагмент которого способен вызвать иммунный ответ (например, гуморальный или клеточный иммунный ответ). Таким образом, согласно настоящему изобретению, например, фрагменты KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, которые соответствуют аминокислотным остаткам, способствующим иммуногенности антигена, и их фрагментам, могут функционировать как антигены, чтобы вызывать иммунный ответ (например, гуморальный или клеточный иммунный ответ). Согласно настоящему изобретению, данный аспект также включает дифференцированно сплайсированные изоформы и различные точки инициации транскрипции полипептидов. Согласно настоящему изобретению эти полипептиды также могут содержать фрагменты, производные и аллельные варианты KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Способы и материалы для получения фрагментов полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 хорошо известны в уровне техники. См., например, Maniatis, et al. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3rd Ed.], Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Варианты полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут сохранять свою антигенную специфичность к связыванию с соответствующими антителами (например, вариант полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 будет связываться анти-KIR2DL1, ICIR2DL2 или ICIR2DL3 антителом). Полностью антигенные варианты могут содержать только консервативные вариации или вариации по незначимым остаткам или в незначимых районах. Антигенные варианты также могут содержать замену на сходные аминокислоты, что не приводит к изменению или приводит к незначительному изменению антигенности. Альтернативно, подобные замены могут до некоторой степени позитивно или негативно влиять на антигенность. Неантигенные варианты обычно содержат одну или более неконсервативную аминокислотную замену, делецию, вставку, инверсию или усечение или замещение, вставку, инверсию или делецию в критической позиции или критическом районе эпитопа. Молекулярно-биологические и биохимические методы для модификации полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 с сохранением специфической антигенности этих полипептидов к соответствующим антителам хорошо известны в уровне техники. См., например, Ho, et al. (1989), Gene, 77(1):51-59; Landt, et al. (1990), Gene, 96(1):125-128; Hopp & Woods (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(6):3824-3828; Kolaskar & Tongaonkar (1990), FEBS Letters, 276(1-2):172-174 и Welling, et al. (1985), FEBS Letters, 188(2):215-218.

Варианты полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 функционируют либо как агонисты (мимикрия) KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, либо как антагонисты KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Варианты полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут быть созданы посредством мутагенеза, например мутации в отдельной точке или усечением полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Агонист полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может сохранять почти полный или частичный набор биологических активностей, свойственных формам полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, встречающимся в естественных условиях. Антагонист полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 мо-

жет ингибировать одну или более активность встречающейся в естественных условиях формы полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, например, путём конкурентного модулирования KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3-опосредованной активности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 полипептида. Таким образом, специфические биологические эффекты могут быть вызваны посредством лечения вариантом с ограниченным функционированием. Например, субъект мог подвергаться лечению вариантом, имеющим частичный набор биологических активностей относительно встречающейся в естественных условиях формы полипептида, вызывающим меньше побочных эффектов у субъекта по сравнению с лечением формой полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, встречающейся в естественных условиях.

Варианты полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, которые функционируют либо как агонисты (мимикрия) KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, либо как антагонисты KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут быть идентифицированы посредством скрининга комбинаторных библиотек мутантов, например концевых делеционных мутантов полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, на их активность как агонистов или антагонистов по отношению к полипептиду KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Пептидомиметики.

В дополнение к полипептидам KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, состоящим только из встречающихся в естественных условиях аминокислот, также предусмотрены пептидомиметики KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Аналоги пептидов широко используют в фармацевтической индустрии как непептидные лекарства со свойствами, аналогичными соответствующим истинным пептидам. Данные типы непептидных соединений обозначают термином "пептидомиметики" (Fauchere (1986), Adv. Drug Res. 15:29; Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics (Volume 2) Andrew Abell (Ed.) (1999), JAI Press, Inc. и Evans et al. (1987), J. Med. Chem. 30:1229) и обычно разрабатывают с помощью компьютерного молекулярного моделирования. Пептидомиметики, имеющие структурное сходство с терапевтически полезными пептидами, могут быть использованы для создания эквивалентного терапевтического или профилактического эффекта. В целом пептидомиметики имеют структурное сходство с истинными полипептидами (т.е. полипептидами, имеющими биологическую или фармакологическую активность), такими как KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 человека или мыши, но необязательно содержат одно или более замещение пептидной связи на связь, выбранную из следующих: $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2-CH_2-$, -CH=CH- (цис- и транс-), $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$ и $-CH_2SO-$, проведенное способами, известными в уровне техники и подробно описанными в следующих ссылках: Spatola in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins Weinstein, B., ed., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Spatola, Vega Data (March 1983), Vol. 1, Issue 3, "Peptide Backbone Modifications"; Morley (1980), Trends. Pharm. Sci. p.463-468; Hudson, et al. (1979), Int. J. Pept. Prot. Res. 14:177-185 ($-CH_2NH-$, CHjCHz-); Spatola, et al. (1986), Life. Sci. 38:1243-1249 ($-CH_2-S$); Hann, (1982), J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I 307-314 (-CH-CH-, cis and trans); Almquist, et al. (1980), J. Med. Chem. 23:1392-1398 ($-COCH_2-$); Jennings-White, et al. (1982), Tetrahedron Lett. 23:2533 ($-COCH_2-$); ($-CH(OH)CH_2-$); Holladay, et al. (1983), Tetrahedron. Lett. 24:4401-4404 (-C(OH)CH-) и Hruby (1982), Life Sci. 31:189-199 ($-CH_2-S-$). Наиболее предпочтительной непептидной связью является $-CH_2NH-$. Такие пептидомиметики могут иметь существенные преимущества над вариантами полипептидов, включая, например: более дешёвое производство, большую химическую стабильность, улучшенные фармакологические свойства (время полужизни, абсорбцию, силу действия, эффективность), изменённую специфичность (например, широкий спектр биологических активностей), сниженную антигенность и др. Мечение пептидомиметиков обычно включает ковалентное связывание одной или более меток напрямую или через спейсер (например, амидогруппу) с невзаимодействующей позицией (позициями) пептидомиметика, которая предсказана количественными данными по взаимосвязи структуры и активности и/или молекулярным моделированием. В целом такими невзаимодействующими позициями являются позиции, которые не формируют прямых контактов с макромолекулой (макромолекулами), с которой связываются пептидомиметики для создания терапевтического эффекта. Создание производных (например, мечение) пептидомиметиков не должно существенно влиять на желаемую биологическую или фармакологическую активность пептидомиметика.

Систематическое замещение одной или более аминокислоты в аминокислотной последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 на D-аминокислоту такого же типа (например, D-лизин вместо L-лизина) может быть использовано для создания более стабильных пептидов. Дополнительно, могут быть созданы стерически ограниченные пептиды, содержащие аминокислотную последовательность KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или почти идентичную последовательность, при помощи известных в уровне техники способов (Rizo and Gierasch (1992), Annu. Rev. Biochem. 61:387); например, путём добавления в цепь остатков цистеина, способных формировать внутримолекулярные дисульфидные мостики, которые циклизуют данный пептид. Аминокислотные последовательности полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, которые здесь описываются, позволят специалистам в данной области техники создать полипептиды, соответствующие последовательностям пептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и вариантам их последовательностей. Подобные полипептиды могут быть получены в клетках-хозяевах прокариот или эукариот путём экспрессии полинуклеотидов, кодирующих последовательности пептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, часто как часть более крупного полипептида. Альтернативно, такие пептиды могут быть синтезированы химическими способами. Способы для экспрессии гетерологичных полипептидов в

рекомбинантных хозяевах, для химического синтеза полипептидов и для трансляции in vitro хорошо известны в уровне техники. Конкретные N-концевые или C-концевые модификации и/или удлинения пептидов по сравнению с исходной последовательностью могут привести к улучшению физических, химических, биохимических и фармакологических свойств, таких как повышенная стабильность, увеличенная сила действия и/или эффективность, устойчивость к сериновым протеазам, желаемые фармакокинетические свойства и другие. Пептиды могут быть использованы терапевтически, для лечения заболевания, например, путём изменения костимуляции у пациента.

Аминокислоты, которые важны для функционирования, могут быть идентифицированы способами, известными в уровне техники, такими как сайт-направленный мутагенез или аланин-сканирующий мутагенез. Cunningham, et al. (1989), Sci. 244:1081-85. Последняя процедура включает точечные замены на аланин каждого из аминокислотных остатков данной молекулы. Затем получающиеся в результате мутантные молекулы анализируют на биологическую активность, такую как связывание эпитопа или ADCC-активность in vitro. Позиции, критичные для связывания лиганда с рецептором, также могут быть определены с помощью структурного анализа, такого как кристаллография, ядерный магнитный резонанс или фотоаффинное мечение. Smith, et al. (1992), J. Mol. Biol. 224:899-904; de Vos, et al. (1992), Sci. 255:306-12.

Например, один класс замен представляет собой консервативные замены аминокислот. Это такие замены, при которых происходит замещение определённой аминокислоты в полипептиде KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 другой аминокислотой со сходными характеристиками. Как консервативные замены обычно рассматривают замены одной аминокислоты на другую аминокислоту среди алифатических аминокислот аланина, валина, лейцина и изолейцина; взаимные замены остатков с гидроксильной группой серина и треонина, взаимные замены кислых остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты, замены между остатками, содержащими амидогруппу, аспарагином и глутамином, взаимные замены междуосновными остатками лизином и аргинином, замены среди ароматических остатков фенилаланина, тирозина. Описание, заключающее, какие аминокислотные замены, вероятно, являются фенотипически незначимыми, находится, например, в Bowie, et al. (1990), Sci. 247:1306-10. Следовательно, обычный специалист в данной области техники должен принимать во внимание, что настоящее изобретение предусматривает варианты пептидов без определения всех конкретных вариантов. Что касается аминокислотных последовательностей, специалист сможет распознать, что отдельные замены, делеции или вставки в нуклеиновой кислоте, пептиде, полипептиде или в белковой последовательности, приводящие к замещению, вставке или удалению аминокислоты или небольшого процентного показателя аминокислот в кодируемой последовательности, являются "консервативно модифицированным вариантом", где данное изменение приводит к замещению аминокислоты на химически сходную аминокислоту. Таблицы консервативных замен, предусматривающие функционально сходные аминокислоты, хорошо известны в уровне техники. Подобные консервативно модифицированные варианты являются дополнением и не исключают полиморфных вариантов, межвидовых гомологов и аллельных вариантов в рамках настоящего изобретения. См., например, Creighton (1992), Proteins: Structures and Molecular Properties [2nd Ed.], W.H. Freeman.

Более того, полипептиды часто содержат аминокислоты, отличные от 20 встречающихся в естественных условиях аминокислот. К тому же, многие аминокислоты, включая концевые аминокислоты, могут быть модифицированы в ходе природных процессов, таких как процессинг и посттрансляционные модификации, или при помощи методов химической модификации, хорошо известных в уровне техники. Известные модификации включают ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение фрагмента гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, внесение перекрёстных сшивок, циклизацию, образование дисульфидных связей, деметилирование, образование ковалентных перекрёстных сшивок, формирование цистина, формирование пироглутамата, формилирование, γ-карбоксилирование, гликозилирование, формирование ГФИ-якоря, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристилирование, окисление, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селенирование, сульфирование, тРНК-зависимое добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование, и убиквитинилирование (но не ограничиваются ими). См. Creighton (1992), Proteins: Structure and Molecular Properties [2nd Ed.] и Lundblad (1995), Techniques in Protein Modification [1st Ed.]. По этой теме доступно множество подробных обзоров. См., например, Wold (1983) Posttranslational Covalent Modification of Proteins Acad. Press, NY; Seifter, et al. (1990), Meth. Enzymol. 182:626-46 и Rattan, et al. (1992), Ann. NY Acad. Sci. 663:48-62.

Фрагменты.

Биологически активная часть полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 включает фрагмент полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, который участвует во взаимодействии между молекулой KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и He-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 молекулой, например природным лигандом KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Биологически активные части полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 включают пептиды, содержащие аминокислотные последовательности, которые в

достаточной мере идентичны аминокислотной последовательности полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или являются её производными, например аминокислотные последовательности, отображённые в SEQ ID NO: 2, 4 или 5, которые включают меньше аминокислот, чем полноразмерные полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, и демонстрируют по меньшей мере одну активность, свойственную полипептиду KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Как правило, биологически активные части содержат домен или мотив по меньшей мере с одной активностью, свойственной полипептиду KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, например свойством модулировать (супрессировать) пролиферативный ответ CD4 Т-клеток на анти-CD3, супрессировать пролиферативный ответ соответствующих специфичных CD4 Т-клеток по антиген-специфичному пути, влиять на экспрессию специфичных цитокинов. Биологически активной частью полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может служить полипептид длиной, например, в 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 или более аминокислот из SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,21,22, 23 или 24. Биологически активные части полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут быть использованы в качестве мишеней для разработки агентов, модулирующих KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3-зависимую активность, например активацию иммунной клетки.

Биологически активная часть полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может содержать по меньшей мере часть внеклеточного домена. Биологически активная часть полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может содержать по меньшей мере часть внеклеточного домена и один или более из следующих доменов: домен сигнального пептида, трансмембранный домен и цитоплазматический домен. Более того, другие биологически активные части, в которых остальные районы полипептида удалены, могут быть созданы методами рекомбинации и оценены на одну или более функциональную активность нативного полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Полипептид KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может иметь аминокислотную последовательность, указанную в последовательностях SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24. Полипептид KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может быть почти идентичным аминокислотным последовательностям: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, сохраняя функциональную активность полипептида, соответствующего данным последовательностям, несмотря на различия в аминокислотной последовательности, вызванные естественным аллельным разнообразием или мутагенезом, как описано здесь.

Химерные белки.

Химерные белки, содержащие полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, также находятся в рамках настоящего изобретения. Например, химерный белок может быть связан с химерным белком GST, где последовательности полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 слиты с С-концом последовательностей GST. Такие химерные белки могут облегчать очистку рекомбинантных полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Альтернативно, полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут быть слиты с белком, связывающим В-клеточные фолликулы, инициируя, таким образом, гуморальный иммунный ответ совместно с активацией Т-клеток. Bemey, et al. (1999), J. Exp. Med. 190:851-60. Альтернативно, например, полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут быть генетически соединены с антителом против дендритных клеток для доставки антигена иммунной системе и стимулирования клеточного иммунного ответа. He, et al. (2004), Clin. Cancer Res. 10:1920-27. Химерный или слитый белок настоящего изобретения может быть создан стандартными методами рекомбинации ДНК. Например, фрагменты ДНК, кодирующие разные полипептидные последовательности, лигируют между собой с сохранением рамки считывания в соответствии с общепринятыми методами, например, с использованием тупых или липких концов для лигирования, расщеплением ферментами рестрикции для получения необходимых концов, заполнением липких концов, если это необходимо, обработкой щелочной фосфатазой для предотвращения нежелательного соединения и ферментативным лигированием. Ген химерного белка может быть синтезирован стандартными методами, включая применение автоматических синтезаторов ДНК.

Химерные белки могут содержать С-концевые или N-концевые транслокации последовательностей. Кроме того, химерные белки могут содержать дополнительные элементы, например, для детекции белка, его очистки или для других применений. Домены, способствующие детекции и очистке, включают пептиды, хелатирующие ион металла, такие как полигистидиновые последовательности, гистидин-триптофановые модули или другие домены, позволяющие выполнять очистку с помощью иммобилизованных ионов металлов; мальтоза-связывающий белок; домены белка А, позволяющие проводить очистку с помощью иммобилизованного иммуноглобулина; или домены, которые используют в системе экспрессии/аффинной очистки с FLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis MO), но не ограничиваются ими.

Химерный белок может быть создан на основе белка настоящего изобретения путём слияния с частью иммуноглобулина, содержащей константный район иммуноглобулина. Более предпочтительно, если иммуноглобулиновая часть содержит константный район тяжёлой цепи, который необязательно и более предпочтительно является человеческим константным районом тяжёлой цепи. Наиболее предпочтительно, если это константный район тяжёлой цепи IgG, и необязательно и наиболее предпочтительно, если это цепь F_C; таким образом, наиболее предпочтительным является фрагмент f_C IgG, содержащий домены C_H2 и C_H3. Хотя, необязательно, может быть использован любой подтип IgG, предпочтительным

является подтип IgG1. Цепь F_C необязательно может быть дикого типа или, альтернативно, может быть мутирована. См., например, опубликованную патентную заявку США номер 2006/0034852. Термин "цепь Fc" также необязательно относится к фрагменту F_C любого типа. Идентифицировано несколько специфических аминокислотных остатков, которые задействованы в опосредованной константным районом активности антитела подкласса IgG. Поэтому включение, замена или удаление этих специфических аминокислот приводит к возникновению или исчезновению специфичной активности, опосредованной константным районом иммуноглобулина. Более того, специфичные замены могут привести, например, к агликозилированию и/или к другим желаемым изменениям в цепи F_C. По меньшей мере, может быть необязательно сделано несколько изменений, чтобы блокировать функцию F_C, которая будет рассматриваться как нежелательная, такая как нежелательное воздействие иммунной системы. См. McCafferty, et al. (2002), Antibody Engineering: A Practical Approach (Eds.) Oxford University Press.

Для облегчения очистки может быть полезным включение между доменом, отвечающим за транслокацию (для эффективной экспрессии на плазматической мембране), и остальной частью транслируемого полипептида расщепляемых линкерных последовательностей, таких как расщепляемой фактором свёртывания крови X (см., например, Ottavi, (1998), Biochimie, 80:289-93), мотив, распознаваемый протеазой субтилизином (см., например, Polyak (1997), Protein Eng. 10:615-19); энтерокиназой (Invitrogen, San Diego, CA.). Например, конструкт может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, соединённый с сайтом шести гистидиновых остатков, за которым следует тиоредоксин, сайт расщепления энтерокиназой (Ссм., например, Williams (1995), Biochemistry, 34:1787-97) и С-концевой домен, отвечающий за транслокацию. Остатки гистидина облегчают детекцию и очистку, тогда как сайт расщепления энерокиназой является средством для очистки желаемого белка (белков) от остальной части химерного белка. Данная технология свойственна для использования векторов, кодирующих химерные белки, и применение химерных белков хорошо описано в научной и патентной литературе. См., например, Kroll (1993,) DNA Cell. Biol. 12:441-53.

Химерный белок может представлять собой KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, слитый с GST, в котором последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 слиты с С-концом последовательностей GST. Такие химерные белки могут способствовать очистке рекомбинантного KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. В другом варианте химерный белок является полипептидом KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, содержащим на N-конце гетерологичную сигнальную последовательность. В другом варианте химерный белок представляет собой KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 слитый с Ig, где последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 слиты с частью молекулы Ig. Участок химерного белка, соответствующий Ig, может также включать константный район иммуноглобулина, например, человеческий Cγ1-домен или Cγ4-домен (например, шарнир, C_H2 и C_H3 человеческого IgCγ1 или человеческого IgCγ4 (см., например, патенты США № 5116964; 5580756; 5844095). Итоговый химерный белок может иметь изменённую растворимость, связывающую аффинность, стабильность и/или валентность (т.е. число сайтов связывания на молекулу) относительно KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и может увеличивать эффективность очистки белка.

Особо предпочтительные химерные белки KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и Ig имеют внеклеточный домен KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, соединённый с константным районом иммуноглобулина (например, с F_C районом). Константный район иммуноглобулина может содержать генетические модификации, которые снижают или устраняют эффекторную активность, являющуюся неотъемлемой для данного участка иммуноглобулина. Например, ДНК, кодирующая внеклеточную часть полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, может быть соединена с ДНК, кодирующей шарнир и районы C_H2 и C_H3 человеческого IgGγ1 и/или IgGγ4, которые модифицированы путём сайт-направленного мутагенеза, например, как указано в WO 97/28267. Химерные белки KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 настоящего изобретения могут быть включены в фармацевтические композиции и введены субъекту in vivo. Химерные белки KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 по изобретению могут быть введены в фармацевтические композиции и могут быть введены субъекту in vivo. Химерные белки KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут быть использованы для изменения биодоступности связывающего партнёра KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Применение химерных белков KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может быть терапевтически полезным для лечения состояния или нарушений, при которых будет полезно модулирование иммунного ответа. Более того, химерные белки KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 настоящего изобретения могут быть использованы как иммуногены для выработки анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антител в субъекте, для очистки белков, связывающих KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, и в анализах скрининга, направленных на идентификацию молекул, которые ингибируют взаимодействие KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 с его природным связывающим партнёром.

Конъюгаты.

Полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут быть конъюгированы с другими фрагментами. Такие конъюгаты часто используют в изготовлении вакцин. Полипептид KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может быть конъюгирован с молекулой углевода (например, маннозой, фукозой, глюкозой, GlcNAc, мальтозой), которая распознаётся маннозным рецептором, представленным на дендритных клетках и

макрофагах. Последующее связывание, агрегация и опосредованный рецептором эндоцитоз и фагоцитоз обеспечивают усиление врождённого и адаптивного иммунитета. См. Mahnke, et al. (2000), J. Cell Biol. 151:673-84; Dong, et al. (1999), J. Immonol. 163:5427-34. Другие партнёры подходящие для конъюгации, направленной на получение иммунного ответа, включают гемоцианин морского моллюска фиссуреллии, дифтерийный токсоид, холерный токсоид, экзобелок А псевдомонад и белки внешней мембраны микроорганизмов (OMPS), но не ограничиваются ими.

Выделение полипептида.

Настоящее изобретение также предусматривает способы для выделения полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 (например, с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24). Например, соответствующие клеточные линии могут быть выделены из пациента, страдающего аутоиммунным или воспалительным расстройством. После гомогенизации и растворении в детергенте, антиген очищают с помощью хроматографии. Для этого может быть использована хроматография, разделяющая по размеру, или аффинная хроматография, и она может быть использована совместно с анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антителами. Например, анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитело может быть иммобилизовано на твёрдом носителе (например, соединено со смолой, магнитными шариками) для однократной адсорбции антигена, отмывки и элюции с твёрдого носителя. Элюированный белок в дальнейшем исследуют на антигенность, характеризуют и идентифицируют. См. Walker (2002), Protein Protocols Handbook [2nd Ed.] Humana Press and Culture (2003), [Ed.] Protein Purification Protocols Humana Press.

Данный антиген, выделенный подобным образом, может быть использован для получения лекарственного препарата с использованием обычного фармацевтического наполнителя и носителя, например введение очищенного антигена in vivo в физиологическом растворе NaCl.

Кроме того, полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, соответствующие настоящему изобретению, могут выступать в качестве антигена при идентификации активностей в рамках скрининга высокой производительности. Способы скрининга высокой производительности известны специалистам в данной области техники. Wells (2002), High Throughout Bioanalytical Sample Preparation Elsevier Health Sciences.

Полинуклеотиды, кодирующие KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Настоящее изобретение также предусматривает нуклеотиды, которые кодируют KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Настоящее изобретение также предусматривает полинуклеотиды, кодирующие полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, соответствующие аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24. Настоящее изобретение также предусматривает фрагменты, гибридизуемые последовательности и последовательности с уровнем гомологии к описанным здесь полинуклеотидным последовательностям по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

Настоящее изобретение также предусматривает полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере одну последовательность, кодирующую сходные полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 с использованием других предпочтительных кодонов, изменённые последовательности, характеризующиеся мутациями, такими как делеция, вставка или замена одного или более нуклеотида, которые либо встречаются в естественных условиях, либо внесены искусственно как случайным, так и сайт-направленным способом. Настоящее изобретение также охватывает гомологичные последовательности нуклеиновых кислот (например, которые составляют часть полинуклеотидной последовательности настоящего изобретения), которые включают районы последовательностей, уникальные для полинуклеотидов настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также охватывает нуклеиновые кислоты, кодирующие гомологи полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, такие гомологи могут иметь по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности аминокислотным последовательностям, раскрытым в настоящем документе, что может быть определено с помощью программы BlastP Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. Настоящее изобретение также охватывает фрагменты описанных выше полинуклеотидов и полипептидов, имеющие мутации, такие как делеции, вставки или замены одного или более нуклеотида, которые либо встречаются в естественных условиях, либо внесены искусственно как случайным, так и сайт-направленным способом.

Молекулы нуклеиновых кислот могут кодировать KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или функциональный фрагмент вышеупомянутой молекулы нуклеиновой кислоты. "Функциональный фрагмент" вышеупомянутой молекулы нуклеиновой кислоты содержит фрагмент гена или кДНК, кодирующий вышеупомянутый KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, который способен быть экспрессированным с получением KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, способного вызвать иммунный ответ (например, антитела, которые селективно связывают KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3). Например, соответствующие настоящему изобретению фрагменты KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, которые соответствуют аминокислотным остаткам, участвующим в иммуногенности антигена, могут выполнять функцию антигенов, т.е. вызывать иммунный ответ (например, гуморальный или клеточный иммунный ответ). Этот аспект настоящего изобретения также включает изоформы, возникшие в результате альтернативного сплайсинга, и альтернативных

точек инициации транскрипции нуклеиновых кислот, соответствующих настоящему изобретению. Молекулы нуклеиновых кислот, соответствующие настоящему изобретению, также содержат фрагменты, производные и аллельные варианты описанных выше молекул нуклеиновых кислот, кодирующих KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, соответствующих настоящему изобретению. Способы и материалы для создания нуклеиновых кислот, кодирующих фрагменты KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, хорошо известны в уровне техники. См., например, Maniatis, et al. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3rd Ed.], Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Молекула нуклеиновой кислоты, охватывающая весь полинуклеотид или его часть, кодирующую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24 или их ортолог, или вариант, может быть выделена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием синтетических олигонуклеотидных праймеров, сконструированных на основе последовательности полинуклеотида, кодирующего аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24.

Молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения может быть амплифицирована с использованием кДНК, мРНК или, альтернативно, геномной ДНК в качестве матрицы и подходящих олигонуклеотидных праймеров в соответствии со стандартными методами ПЦР-амплификации. Амплифицированная таким образом молекула нуклеиновой кислоты может быть клонирована в подходящий вектор и охарактеризована путём секвенирования ДНК. К тому же, олигонуклеотиды, соответствующие нуклеотидным последовательностям KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут быть изготовлены стандартными методами синтеза, например, с использованием автоматического синтезатора ДНК.

В одном варианте, выделенная молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, кодирующая KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, содержит нуклеотидную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1 или 3, или её фрагмент. В другом варианте, молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения содержит молекулу нуклеиновой кислоты, комплементарную нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1 или 3, или части любой из этих нуклеотидных последовательностей. Молекула нуклеиновой кислоты, комплементарная полинуклеотиду, кодирующему аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, представляет собой последовательность, в достаточной степени комплементарную нуклеотидной последовательности полинуклеотида, кодирующего аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, чтобы гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью полинуклеотида, кодирующего аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, формируя стабильный дуплекс.

Ещё в одном варианте, выделенная молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на около 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 99,5% идентична полноразмерному полинуклеотиду, кодирующему аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24 или часть любой из этих нуклеотидных последовательностей.

Более того, молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения может содержать только часть полинуклеотида, кодирующего аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, например фрагмент, который может быть использован как зонд или праймер, или фрагмент, кодирующий часть полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, например, биологически активную часть полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Нуклеотидные последовательности, определенные в результате клонирования гена PD-L2 человека, позволяют создавать зонды и праймеры для идентификации и/или клонирования других членов семейства PD-L2, так же как и гомологов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 из других видов. Зонд/праймер, как правило, представляет собой в значительной степени очищенный олигонуклеотид. Этот олигонуклеотид обычно содержит район нуклеотидной последовательности, который гибридизуется в жёстких условиях по меньшей мере с около 12 или 15, предпочтительно с около 20 или 25, более предпочтительно с около 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 или 75 последовательно расположенными нуклеотидами смысловой последовательности SEQ ID NO: 1 или 3; антисмысловой последовательности полинуклеотида, кодирующего аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, или аллельного варианта, встречающегося в естественных условиях, или мутанта полинуклеотида, кодирующего аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24.

В одном варианте молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения содержит нуклеотидную последовательность, которая длиннее чем около 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950 или более нуклеотидов и гибридизуется в жёстких условиях с полинуклеотидом, кодирующим аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, или с комплементарной ему последовательностью. В следующем варианте молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения содержит нуклеотидную последовательность, которая длиннее чем около 880-900, 900-950, 950-1000, 1000-1050, 1050-1100, 1100-1150 или более нуклеотидов и гибридизуется в жёстких условиях с полинуклеотидом, кодирующим аминокислотные последовательности

SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, или с комплементарной ему последовательностью. В ещё одном варианте молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения содержит нуклеотидную последовательность, которая длиннее чем 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300 или более нуклеотидов и гибридизуется в жёстких условиях с молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид, кодирующий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, или комплементарную ему последовательность. В ещё одном варианте молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения содержит нуклеотидную последовательность, которая длиннее чем около 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500,500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 850-900, 900-950 или более нуклеотидов, включает по меньшей мере около 15 (т.е. 15 последовательных) нуклеотидов из последовательности, кодирующей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, или комплементарной ей последовательности, и гибридизуется в жёстких условиях с молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид, кодирующий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, или комплементарной ей последовательностью.

Зонды, основанные на нуклеотидных последовательностях KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут быть использованы для обнаружения транскриптов или последовательностей генома, кодирующих идентичные или гомологичные полипептиды. В вариантах осуществления данный зонд дополнительно содержит прикреплённую группу, служащую меткой, например, данная группа может быть радиоактивным изотопом, флуоресцентным соединением, ферментом, или кофактором фермента. Такие зонды могут быть использованы как часть диагностического набора для идентификации клеток или ткани, в которых изменена экспрессия полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, путём измерения в образце клеток субъекта уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, например, определения уровней мРНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, или анализом на делетированность или на наличие мутаций KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в геноме.

В дополнение к нуклеотидным последовательностям KIR2DL1, KIR2DL2 и ICIR2DL3 полинуклеотида, кодирующего аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24, специалистам в данной области техники будет очевидно, что внутри популяции (например, популяции людей) могут существовать полиморфизмы последовательности ДНК, приводящие к изменениям в аминокислотных последовательностях полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Такой генетический полиморфизм генов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может существовать среди индивидуумов внутри популяции вследствие наличия естественных аллельных вариантов. Под терминами "ген" и "рекомбинантный ген", как они использованы здесь, подразумеваются молекулы нуклеиновых кислот, имеющие открытую рамку считывания, кодирующую полипептид KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, предпочтительно полипептид KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 млекопитающих, и способные дополнительно включать некодирующие регуляторные последовательности и интроны.

Аллельные варианты человеческого или мышиного KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 включают как функциональные, так и нефункциональные полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Функциональные аллельные варианты представляют собой встречающиеся в естественных условиях варианты аминокислотной последовательности человеческого или мышиного полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, которые сохраняют способность связывать природных партнёров связывания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и/или модулировать пролиферацию $CD4^+$ или $CD8^+$ Т-клеток, синтез цитокинов и активацию лимфоцитов. Функциональные аллельные варианты обычно содержат исключительно консервативные замены одной или более аминокислот в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24 или замену, делецию или вставку незначащих остатков в незначимых районах данного полипептида.

Нефункциональные аллельные варианты представляют собой встречающиеся в естественных условиях варианты аминокислотных последовательностей человеческого или мышиного полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, которые не способны связывать природных партнёров связывания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и/или модулировать любые описанные здесь активности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Нефункциональные аллельные варианты, как правило, содержат неконсервативную замену, делецию или вставку или усечение в ходе созревания в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 и 24 или замену, вставку или делецию значащих остатков или в значимых районах данного полипептида.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает не человеческие, не мышиные ортологи человеческого или мышиного полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Ортологами человеческого полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 являются полипептиды, которые выделены не из человека или мыши и обладают точно такой же связывающей активностью и/или способностью модулировать активацию лимфоцитов, и способностью модулировать пролиферацию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток и синтез цитокинов, как и описанные здесь человеческие и мышиные полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Мутантный полипептид KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может быть проанализирован на способность связывать и/или модулировать активность природного партнёра связывания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, модулировать внутри- или межклеточную сигнализацию, модулировать активацию Т-лимфоцитов и/или модулировать иммунный ответ организма.

Выделены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и химерные белки KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Такие молекулы нуклеиновых кислот, содержащие, по меньшей мере, первую нуклеотидную последовательность, кодирующую KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или белок, полипептид или пептид KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, искусственно слитый со второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок, полипептид или пептид, не являющийся KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут быть созданы стандартными методами рекомбинации ДНК.

Более того, идентичность подразумевает в широком смысле функциональную и/или структурную эквивалентность между рассматриваемыми молекулами нуклеиновых кислот или кодируемыми ими белками. Молекулы нуклеиновых кислот, которые гомологичны описанным выше молекулам и входят в число производных этих молекул, в целом являются вариантами этих молекул, имеющими модификации, выполняющие одинаковую биологическую функцию. В то же время эти варианты могут встречаться в естественных условиях, например, они могут быть последовательностями других видов или мутантами, где мутанты могут возникнуть природным путем или могут быть получены в ходе направленного мутагенеза. Варианты также могут быть искусственно синтезированными последовательностями. Аллельные варианты могут встречаться в естественных условиях, а также быть искусственно синтезированными или созданными методами рекомбинантной ДНК. Молекулы нуклеиновых кислот, которые являются производными молекул нуклеиновых кислот, соответствующих настоящему изобретению, вследствие вырожденности генетического кода являются особой формой производных.

В рамки настоящего изобретения также входит любая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Поскольку генетический код вырожден, для кодирования конкретной аминокислоты может быть использован более чем один кодон. С использованием генетического кода может быть идентифицирован один или более разных нуклеотидов, каждый из которых способен кодировать данную аминокислоту. Вероятность того, что определённый нуклеотид фактически войдёт в состав рассматриваемого кодона кодирующей последовательность, может быть оценена с учётом неправильного спаривания нуклеотидов и частоты, с которой конкретный кодон используют (для кодирования определённой аминокислоты) в эукариотических или прокариотических клетках, экспрессирующих KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Такие "правила использования кодонов" описаны в Lathe, et al. (1985), J. Molec. Biol. 183:1-12.

Модифицированные полинуклеотиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Полинуклеотиды настоящего изобретения могут быть модифицированными. Немодифицированные полинуклеотиды часто менее оптимальны в некоторых случаях, например, склонны к расщеплению клеточными нуклеазами. Химические модификации одной или более субъединицы олигонуклеотида могут улучшить его свойства, например сделать полинуклеотиды более устойчивыми к нуклеазам. Типичные модификации нуклеотидов хорошо известны в уровне техники и могут включать один или более случай: (I) изменения, например, замены одного или обоих атомов кислорода, не связанных с фосфатной группой, и/или замены одного или более атомов кислорода, связанных с фосфатной группой, формирующей фосфодиэфирную связь; (II) изменения, например, замены составной части рибозы, например, модификации или замены 2'-гидроксильной группы рибозы; (III) полной замены фосфатной группы; (IV) модификации или замены встречающегося в естественных условиях азотистого основания искусственным основанием; (V) замены или модификации рибозофосфатного остова, например, пептидно-нуклеиновой кислотой (ПНК); (VI) модификации 3'- или 5'-конца олигонуклеотида и (VII) модификации рибозы, например, создание гексозных колец. Полинуклеотиды, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть синтезированы любым количеством способов, хорошо известных в уровне техники, или приобретены у различных коммерческих поставщиков (LC Sciences, Houston, TX; Promega, Madison, WI; Invitrogen, Carlsbad, CA).

Антисмысловые последовательности.

В дополнение к описанным выше молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, другой аспект настоящего изобретения относится к отдельным молекулам нуклеиновых кислот, которые являются антисмысловыми по отношению к ним. "Антисмысловая" нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна "смысловой" нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид, например, комплементарна кодирующей цепи двухцепочечной молекулы кДНК или комплементарна последовательности мРНК. Соответственно, антисмысловая нуклеиновая кислота может связываться со смысловой за счёт водородных связей. Антисмысловая нуклеиновая кислота может быть комплементарна всей цепи, кодирующей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или только её части. В одном варианте антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты является антисмысловой по отношению к "кодирующему району" цепи нуклеотидной последовательности, кодирующей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Термин "кодирующий район" обозначает район нуклеотидной последовательности, содержащий кодоны, которые транслируются в аминокислотные ос-

татки. В другом варианте антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты является антисмысловой по отношению к "некодирующему району" кодирующей цепи нуклеотидной последовательности, кодирующей PD-L. Термин "некодирующий район" обозначает последовательности, фланкирующие кодирующий район с 5'- и 3'-концов, которые не транслируются в аминокислоты (также обозначаемые как 5'- и
3'-нетранслируемые районы). С использованием описанных здесь последовательностей цепей, кодирующих человеческий или мышиный KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут быть сконструированы антисмысловые нуклеотидные последовательности настоящего изобретения, в соответствии с правилами Уотсон-Криковского спаривания оснований.

Антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты может быть комплементарна всему району мРНК, кодирующему KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, но более предпочтительным является олигонуклеотид, антисмысловой только по отношению к части кодирующего или некодирующего KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 района мРНК. Например, антисмысловой олигонуклеотид может быть комплементарен району, окружающему сайт инициации трансляции KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, или комплементарен мРНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Антисмысловой олигонуклеотид может быть длиной, например, около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 нуклеотидов. Антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения может быть создана с использованием реакций химического синтеза или ферментативного лигирования, с использованием методик, известных в уровне техники. Например, антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты (например, антисмысловой олигонуклеотид) может быть химически синтезирован с использованием нуклеотидов, встречающихся в естественных условиях, или поразному модифицированных нуклеотидов, специально разработанных для увеличения биологической стабильности молекул или для увеличения физической стабильности дуплекса, который формируется между смысловой и антисмысловой молекулами нуклеиновых кислот, например, могут быть использованы производные фосфоротиоата и нуклеотиды, замещённые акридином. Примеры модифицированных нуклеотидов, которые могут быть использованы для создания антисмысловой нуклеиновой кислоты, включают 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-хлорурацил, 5-иодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-карбоксигидроксиметилурацил, 5-кабоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, β-D-галактозилквеозин, инозин, N6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилинозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, β-D-маннозилквеозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, урацил-5-оксиацетат (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, урацил-5-метилуксусный эфир, 5-метил-2-тиоурацил, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропилурацил, (acp3)w и 2,6-диаминопурин. Альтернативно, антисмысловая нуклеиновая кислота может быть создана биологически с использованием экспрессионного вектора, куда клонирована нуклеиновая кислота в антисмысловой ориентации (т.е. РНК, транскрибированная со вставленной нуклеиновой кислоты, будет в антисмысловой ориентации по отношению к целевой нуклеиновой кислоте, что описано ниже в следующем пункте).

Молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, как правило, вводят субъекту или получают in situ таким образом, что они гибридизуются или связываются с клеточной мРНК и/или геномной ДНК, кодирующей полипептид KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, ингибируя таким образом экспрессию полипептида, например, путём ингибирования транскрипции и/или трансляции. Гибридизация может идти за счёт обычной комплементарности нуклеотидов с формированием стабильного дуплекса или, например, в случае, когда антисмысловая молекула ДНК, которая связывается с дуплексами ДНК, за счёт специфичных взаимодействий в большой бороздке двойной цепи. Примером пути введения антисмысловых молекул нуклеиновых кислот настоящего изобретения является прямая инъекция в область ткани. Альтернативно, антисмысловые молекулы нуклеиновых кислот могут быть модифицированы для направления в выбранные клетки, а затем введены системно. Например, для системного введения антисмысловые молекулы могут быть так модифицированы, что они будут специфически связываться с рецепторами или антигенами, экспрессированными на поверхности выбранной клетки, например, посредством связывания антисмысловых молекул нуклеиновых кислот с пептидами или антителами, которые связываются с рецепторами клеточной поверхности или с антигенами. Антисмысловые молекулы нуклеиновых кислот также могут быть доставлены в клетки путём использования векторов, описанных в настоящем документе. Для достижения достаточных внутриклеточных концентраций антисмысловых молекул, предпочтительными являются векторные конструкты, в которые помещена антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты под контролем сильного промотора pol II или pol III.

Антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может быть α-аномерной молекулой нуклеиновой кислоты. γ-аномерная молекула нуклеиновой кислоты формирует специфичные двухцепочечные гибриды с комплементарной РНК, в которой, в противоположность обычным β-структурам, цепи идут параллельно друг другу. Gaultier, et al. (1987), Nucleic Acids Res. 15:6625-

6641. Антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты также может содержать 2'-О-метилрибонуклеотид (Inoue, et al. (1987), Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) или химерный РНК-ДНК-аналог (Inoue, et al. (1987), FEBS Lett. 215:327-330).

Антисмысловая нуклеиновая кислота KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может быть рибозимом. Рибозимами являются каталитические молекулы РНК с рибонуклеазной активностью, которые способны разрезать одноцепочечную нуклеиновую кислоту, такую как мРНК, с которой они имеют район комплементарности. Так, рибозимы (например, hammerhead-рибозимы (описанные в Haseloff and Gerlach (1988), Nature, 334:585-591)) могут быть использованы для каталитического расщепления транскриптов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, ингибируя таким образом трансляцию мРНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Рибозим, имеющий специфичность к нуклеиновой кислоте, кодирующей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, может быть разработан на основании указанной здесь нуклеотидной последовательности кДНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Например, может быть сконструировано производное L-19 IVS РНК простейшего Tetrahymena, в котором нуклеотидная последовательность активного сайта является комплементарной разрезаемой нуклеотидной последовательности мРНК, кодирующей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. См., например, патенты США № 4987071 и 5116742. Альтернативно, мРНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может быть использована для селекции из пула молекул РНК каталитической РНК, имеющей специфическую рибонуклеазную активность. См., например, Bartel and Szostak (1993), Science, 261:1411-1418.

Альтернативно, экспрессия гена KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может быть ингибирована нуклеотидными последовательностями, комплементарными регуляторному району KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 (например, промотору и/или энхансерам KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3), приводящими к формированию структур с тройной спиралью, которые препятствуют транскрипции гена KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в клетках мишенях. См. в целом Helene (1991), Anticancer Drug Des. 6(6):569-84; Helene, et al. (1992, Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:27-36; and Maher, L. J. (1992), Bioassays, 14(12):807-15.

Пептидно-нуклеиновые кислоты.

В ещё одном варианте молекулы нуклеиновой кислоты KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 настоящего изобретения могут быть модифицированы по фрагменту азотистого основания, по фрагменту рибозы или фосфатного остова для улучшения, например, стабильности, гибридизации или растворимости молекулы. Например, дезоксирибозофосфатный остов молекул нуклеиновых кислот может быть модифицирован, чтобы создать пептидно-нуклеиновые кислоты. См. Hyrup and Nielsen (1996), Bioorg. Med. Chem. 4(1):5-23. Под терминами "пептидно-нуклеиновые кислоты" или "ПНК", как они использованы здесь, подразумевается имитация нуклеиновой кислоты, например имитация ДНК, в которой дезоксирибозофосфатный остов замещён псевдопептидной цепью с сохранением только четырёх природных азотистых оснований. Показано, что нейтральные цепи ПНК гибридизуются с ДНК и РНК в условиях низкой ионной силы. Синтез олигомеров ПНК может быть осуществлён с использованием стандартных протоколов твердофазного пептидного синтеза, как описано в Hyrup and Nielsen (1996), выше, и в Perry-O'Keefe, et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:14670-675.

ПНК, соответствующие молекулам нуклеиновых кислот KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут применяться в терапевтических и диагностических целях. Например, ПНК могут быть использованы как антисмысловые или антигенные агенты для специфичной к последовательности модуляции генной экспрессии, например, индукции остановки транскрипции или трансляции или ингибирования репликации. ПНК, соответствующие молекулам нуклеиновых кислот KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут также применяться в анализе точечных мутаций в гене (например, путём ПНК-направленной остановки ПЦР); использоваться как "искусственные ферменты рестрикции" в комбинации с другими ферментами (например, S1 нуклеазой (Hyrup and Nielsen (1996), выше)) или как зонды или праймеры для секвенирования ДНК или гибридизации (Hyrup and Nielsen (1996), выше; Perry-O'Keefe et al. (1996), выше).

ПНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут быть модифицированы (например, для усиления их стабильности или клеточного поглощения) путём присоединения липофильных или других вспомогательных групп к ПНК, путём формирования химерных ПНК-ДНК конструктов или путём использования липосом или других методов доставки лекарств, известных в уровне техники. Например, могут быть созданы химерные ПНК-ДНК конструкты нуклеиновых кислот KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и других молекул, в которых могут комбинироваться преимущественные свойства ПНК и ДНК. Такие химерные конструкты позволяют ферментам, узнающим ДНК (например, РНКазе Н и ДНК-полимеразам), взаимодействовать с участком ДНК, тогда как участок ПНК обеспечивает высокую связывающую аффинность и специфичность. Химерные ПНК-ДНК конструкты могут быть соединены с использованием линкеров подходящей длины, подобранной с учётом стэкинг-взаимодействия азотистых оснований, количеством связей между ними, а также с учётом пространственной ориентации (Hyrup and Nielsen (1996), выше). Синтез химерных ПНК-ДНК конструктов может быть осуществлён в соответствии с описанием в Hyrup and Nielsen (1996), выше и в Finn P.J. et al. (1996), Nucleic Acids Res. 24(17):3357-63. Например, цепь ДНК может быть синтезирована на твердой подложке с использованием стандартного фосфоамидитного синтеза, и модифицированные аналоги нуклеозидов, например, 5'-(4-метокситритил)амино-5'-дезокситимидинфосфоамидит могут быть использованы в качестве сшивки между ПНК и 5'-концом ДНК

(Mag, M. et al. (1989), Nucleic Acids Res. 17:5973-88). Мономеры ПНК затем пошагово присоединяются для получения химерной молекулы с 5'-ПНК сегментом и 3'-ДНК сегментом (Finn P.J. et al. (1996), выше). Альтернативно, химерные молекулы могут быть синтезированы с 5'-ДНК сегментом и 3'-ПНК сегментом (Peterser, et al. (1975), Bioorganic Med. Chem. Lett. 5:1119-11124).

Олигонуклеотиды.

Олигонуклеотид может включать другие присоединенные группы, такие как пептиды (например, для направления к рецептору клетки-хозяина in vivo) или агенты, облегчающие транспорт через клеточные мембраны (см., например, Letsinger et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6553-6556; Lemaitre et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:648-652; опубликованную заявку WO 88/09810) или гематоэнцефалический барьер (см., например, PCT Publication No. WO 89/10134). Кроме того, олигонуклеотиды могут быть модифицированы расщепляющими агентами, активируемыми гибридизацией (см., например, Krol et al. (1988), Biotechniques, 6:958-976), или интеркалирующими агентами (см., например, Zon (1988), Pharm. Res. 5:539-549). С этой целью олигонуклеотид может быть конъюгирован с другой молекулой (например, с пептидом, кросс-сшивающим агентом, активируемым гибридизацией, транспортирующим агентом или расщепляющим агентом, активируемым гибридизацией).

Экспрессия.

Выделение и экспрессия KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 согласно изобретению могут быть осуществлены с помощью хорошо разработанных способов клонирования с использованием зондов или праймеров, сконструированных на основе нуклеотидных последовательностей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, описанных в документе. Родственные последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 также могут быть найдены в геномных базах данных человека или других организмов с использованием приведённых здесь последовательностей и известных поисковых компьютерных технологий, например, поиска последовательностей BLAST. Псевдогены, описанные здесь, могут быть использованы для идентификации функциональных аллелей или родственных генов.

Экспрессионные векторы могут быть далее использованы для заражения или трансфекции клеток-хозяев с целью функциональной экспрессии этих

последовательностей. Эти гены и векторы могут быть сконструированы и экспрессированы in vitro или in vivo. Специалисту будет понятно, что желаемые фенотипы для изменения и управления экспрессией нуклеиновой кислоты могут быть получены посредством модулирования экспрессии или активности генов и нуклеиновых кислот (например, с помощью промоторов, энхансеров) в векторах данного изобретения. Может быть использован любой из известных способов, описанных для повышения или снижения экспрессии или активности.

В другом воплощении рекомбинантный экспрессирующий вектор млекопитающих способен направлять экспрессию нуклеиновой кислоты преимущественно в определённом типе клеток (например, используют тканеспецифичные регуляторные элементы для экспрессии нуклеиновой кислоты). Тканеспецифичные регуляторные элементы известны в данной области. Не ограничивающиеся примеры подходящих тканеспецифичных промоторов включают промотор альбумина (специфичный для печени; Pinkert et al. (1987), Genes Dev. 1:268-277), специфичные для лимфоидных клеток промоторы (Calame и Eaton (1988), Adv. Immunol. 43:235-275), определённые промоторы Т-клеточных рецепторов (Winoto and Baltimore (1989), EMBO J. 8:729-733) и иммуноглобулинов (Baneiji et al. (1983), Cell, 33:729-740; Queen and Baltimore (1983), Cell, 33:741-748), нейрон-специфичные промоторы (например, промотор нейрофиламентов; Byrne and Ruddle (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5473-5477), промоторы, специфичные для поджелудочной железы (Edlund et al. (1985), Science, 230:912-916) и молочной железы (например, промоторы белков молочной сыворотки; патент США № 4873316 и европейская патентная заявка № 264166). В число промоторов, регулируемых в ходе развития, также включены, например, мышиные промоторы Hox-генов (Kessel and Gruss (1990), Science, 249:374-379) и промотор α-фетопротеина (Campes and Tilghman (1989), Genes Dev. 3:537-546).

Данные полинуклеотидные последовательности настоящего изобретения могут быть получены в соответствии с любым способом синтеза олигонуклеотидов, известным в данной области, таким как ферментативный синтез или твердофазный синтез. Оборудование и реагенты для проведения твердофазного синтеза коммерчески доступны, например, от Applied Biosystems. Любые другие средства для такого синтеза также могут быть применены; условия синтеза таких полинуклеотидов могут быть определены специалистом в данной области техники. См., например, Maniatis, et al. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3rd Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press; Swamy (2008), Laboratory Manual on Biotechnology Rastogi Publications; Herdewijn (2005), [Ed.] Methods in Molecular Biolog: Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications Volume 288, Humana Press; и Rapley (2000), [Ed.] The Nucleic Acid Protocols Handbook Humana Press. Двухцепочечные фрагменты ДНК далее могут быть получены или способом синтеза комплементарной цепи и гибридизации цепей в соответствующих условиях, или способом достраивания комплементарной цепи с применением ДНК-полимеразы и праймера с соответствующей последовательностью.

Способы для манипуляций с нуклеиновыми кислотами, например, такие как создание мутаций в последовательности, субклонирование, мечение зондами, секвенирование, гибридизация, подробно опи-

саны в научной и патентной литературе. См., например, Sambrook, et al. (2001), (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory; Ausubel, et al. (2011), Ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York; Tijssen (1993) [Ed.] Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I, Theory and Nucleic Acid Preparation, Elsevier, NY.

Гибридизация и сила гибридизации (например, прочность межнуклеотидной связи) зависят от многих факторов, хорошо известных в данной области, в том числе от степени комплементарности между полинуклеотидами и жесткости используемых условий, которая зависит от таких факторов, как концентрация соли, присутствие других компонентов (например, наличие или отсутствие полиэтиленгликоля), молярность гибридизуемых цепей и G+C состав полинуклеотидных цепей, каждый из которых приводит к характерной температуре плавления (Tm) образовавшегося гибрида. Способы гибридизации нуклеиновых кислот описаны в Sambrook, et al. (2001), (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3rd Ed.], Cold Spring Harbor Laboratory, and by Haymes, et al. (1985), in Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach (IRL Press, DC). Условия отмывания гибридных молекул могут включать в себя промывочный раствор 0,2× SSC/0,1% SDS и инкубацию с перемешиванием вращением в течение 10 мин при комнатной температуре (отмывание в условиях пониженной жёсткости); предварительно прогретый (42°C) промывочный раствор 0,2× SSC/0,1% SDS и инкубацию с перемешиванием вращением в течение 15 мин при 42°C (отмывание в условиях средней жёсткости); или предварительно прогретый (68°C) промывочный раствор 0,1× SSC/0,1% SDS и инкубацию с перемешиванием вращением в течение 15 мин при 68°C (отмывание в условиях высокой жёсткости). См. Ausubel, et al. (2011), [Ed.] Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc.

Олигонуклеотидные праймеры могут быть использованы для амплификации нуклеиновых кислот, кодирующих KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Нуклеиновые кислоты, описанные здесь, могут также быть клонированы или измерены количественно с использованием способов амплификации. Способы амплификации также хорошо известны в данной области и включают, например, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (Innis (1990) [Ed.] PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, Academic Press, NY.; Innis (1995), [Ed.] PCR Strategies, Academic Press, Inc., NY.); лигазую цепную реакцию (ЛЦР) (Wu (1989), Genomics 4: 560; Landegren (1988), Science, 241:1077; Barringer (1990), Gene, 89:117); амплификацию транскрипцией (Kwoh (1989), PNAS, 86:1173); самоподдерживающуюся репликацию последовательности (Guatelli (1990), PNAS, 87:1874), амплификацию Q-бета репликазой (Smith (1997), J. Clin. Microbiol. 35:1477-91)), автоматизированный амплификационный анализ с Q-бета репликазой (Burg (1996), Mol. Cell. Probes, 10:257-71) и другие способы с использованием РНК-полимеразы (например, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario). См. также Berger (1987), Methods Enzymol. 152:307-16; Sambrook, et al. (2001), (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory; Ausubel, et al. (2011), [Ed.] Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York; Maniatis, et al. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3rd Ed.], Cold Spring Harbor Laboratory Press; патенты США № 4683195 и 4683202; Sooknanan (1995), Biotechnology, 13:563-64.

Принципы конструирования вырожденных пар праймеров хорошо известны в данной области. Например, алгоритм создания консенсусных вырожденных гибридных олигонуклеотидных праймеров (CODEHOP) является легкодоступным и напрямую связан с сайтом множественного выравнивания последовательностей BlockMaker для предсказания последовательностей гибридных праймеров, начиная с последовательностей ряда родственных белков, таких как последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, представленные в данном документе. См., например, Rose (1998,) Nucleic Acids Res. 26:1628-35; Singh (1998), Biotechniques, 24:318-19.

Полиморфные варианты, аллели и межвидовые гомологи, которые в значительной степени являются идентичными KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, описанным в данном документе, могут быть выделены с использованием нуклеотидных зондов, описанных выше. В альтернативном варианте для клонирования KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и полиморфных вариантов, аллелей и межвидовых гомологов могут быть использованы экспрессионные библиотеки, анализируемые путем иммунологического детектирования экспрессируемых гомологов с использованием антисывороток или очищенных антител к KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, которые также распознают и селективно связываются с гомологами KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие KIR2DL1, KIR2DL2 и ICIR2DL3, могут быть получены путем амплификации (например, ПЦР) соответствующих последовательностей нуклеиновых кислот с использованием соответствующих (идентичных или вырожденных) пар праймеров. Такой амплифицируемой нуклеиновой кислотой может быть геномная ДНК из любой клетки или ткани или мРНК, или кДНК, полученная из клеток, экспрессирующих KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Способы экспрессии гетерологичных последовательностей в клетках-хозяевах хорошо известны в данной области техники. См., например, Maniatis, et al. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3rd Ed.], Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Белки слияния, содержащие KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Могут быть сконструированы гибридные кодирующие белок последовательности, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, слитые с последовательностями транслокации. Также предусмотрены гибридные последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, содержащие мотивы и антигенные области. Эти нуклеотидные последовательности могут быть функционально связаны с элементами контроля транскрипции или трансляции, например, последовательностями инициации транскрипции или трансляции, промоторами или энхансерами, терминаторами транскрипции или трансляции, последовательностями полиаденилирования и другими важными для транскрибирования ДНК в РНК последовательностями. В состав конструкции рекомбинантных экспрессионных кассет, векторов или трансгенных элементов может быть включен фрагмент промотора для обеспечения прямой экспрессии желаемой нуклеиновой кислоты во всех интересующих клетках или тканях.

Белки слияния могут содержать С-концевые или N-концевые последовательности транслокации. Кроме того, белки слияния могут содержать дополнительные элементы, например участки, необходимые для детектирования белка, его очистки или других задач. Домены, облегчающие детектирование и очистку, включают, например, металл-хелатирующие пептиды, такие как полигистидиновые участки, гистидин-триптофановые модули или другие домены, которые позволяют проводить очистку на иммобилизованных атомах металлов; связывающий мальтозу белок; домены белка А, которые позволяют проводить очистку на иммобилизованном иммуноглобулине; или домен, используемый в системах FLAG мечения/аффинной очистки (Sigma-Aldrich).

Включение расщепляющихся линкерных последовательностей, таких как последовательности, расщепляемые фактором Ха (см., например, Ottavi, (1998), Biochimie 80:289-93), мотив, распознаваемый протеазой субтилизином (см., например, Polyak (1997), Protein Eng. 10:615-19), энтерокиназой (Invitrogen, San Diego, CA.), между доменом транслокации (для эффективной экспрессии на плазматической мембране) и остальным транслируемым полипептидом может быть полезно для облегчения очистки. Например, одна конструкция может включать в себя полипептид, кодируемый нуклеотидной последовательностью, связанный с шестью остатками гистидина и тиоредоксином, сайт, расщепляемый энтерокиназой (см., например, Williams (1995), Biochemistry, 34:1787-97), и С-концевой домен транслокации. Гистидиновые остатки облегчают детектирование и очистку, в то время как сайт, расщепляемый энтерокиназой, обеспечивает очистку целевого белка (белков) от дополнительных полипептидов в составе белка слияния. Технология, относящаяся к созданию векторов, кодирующих белки слияния, и применению слитых белков, подробно описана в научной и патентной литературе. См., например, Kroll (1993), DNA Cell. Biol. 12:441-53.

Системы для рекомбинантной экспрессии полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 И KIR2DL3 и анти-KIR2DLL, KIR2DL2 и KIR2DL3 антител.

Экспрессионные векторы либо как отдельные векторы, либо как библиотеки векторов, содержащие кодирующую последовательность лиганд-связывающего района, могут быть введены в геном, или в цитоплазму, или в ядро клетки и экспрессированы с помощью различных стандартных способов, подробно описанных в научной и патентной литературе. См., например, Sambrook, et al. (2001), [Eds.] Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory; Ausubel, et al. (2011), [Ed.] Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc.

Нуклеиновые кислоты могут быть экспрессированы в составе экспрессионных кассет, векторов или вирусов, которые стабильно или временно экспрессируются в клетках (например, эписомные системы экспрессии). Выбранные маркеры могут быть включены в экспрессионные кассеты и векторы для создания селектируемого фенотипа трансформированных клеток и последовательностей. Например, селективные маркеры могут поддерживать эписомные структуры и репликацию, так что интеграция в геном хозяина не требуется. Например, маркер может кодировать устойчивость к антибиотику (например, хлорамфениколу, канамицину, G418, блеомицину, гигромицину) или устойчивость к гербициду (например, хлорсульфурону или Basta), для того чтобы обеспечить селекцию клеток, трансформированных интересующими ДНК. См., например, Ausubel, et al. (2011), [Ed.] Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc.; и Walker & Papley (2009), Molecular Biology and Biotechnology [5th Ed.], Royal Society of Chemistry. Поскольку селектируемые гены-маркеры, обеспечивающие устойчивость к таким субстратам, как неомицин или гигромицин, могут быть использованы только в культуре ткани, гены химической устойчивости также используют в качестве селектируемых маркеров in vitro и in vivo.

Для того чтобы обеспечить клеточную экспрессию полинуклеотидов настоящего изобретения, может быть использована нуклеотидная конструкция в соответствии с настоящим изобретением, которая включает в себя, по меньшей мере, кодирующую область одной из вышеуказанных нуклеотидных последовательностей и дополнительно включает в себя по меньшей мере один цис-регуляторный элемент. Предпочтительно, чтобы промотор, используемый в нуклеотидной конструкции настоящего изобретения, являлся активным в определенной трансформируемой клеточной популяции. Примеры промоторов, специфичных для определённых типов клеток и/или тканей, хорошо известны в данной области. См. Bemardi (2003), [Ed.] Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells Volume 38 Elsevier Science B.V.

Нуклеотидная конструкция настоящего изобретения может также включать в себя энхансер, который может находиться в непосредственной близости или далеко от промоторной последовательности и может участвовать в усилении транскрипции последовательности.

Желательно, чтобы нуклеотидная конструкция согласно настоящему изобретению дополнительно включала в себя подходящий селектируемый маркер и/или точку начала репликации. Предпочтительна ситуация, когда используемая нуклеотидная конструкция является челночным вектором, который может реплицироваться как в E.coli (где эта конструкция содержит соответствующий селектируемый маркер и точку начала репликации), так и подходить для репликации в клетках или интеграции в геном выбранной ткани. Конструкция согласно настоящему изобретению, может быть, например, плазмидой, бакмидной, фагмидой, космидой, фагом, вирусом или искусственной хромосомой.

Не ограничивающие примеры включают pcDNA3, pcDNA3.1 (+/-), pGL3, PzeoSV2 (+/-), pDisplay, PEF/myc/cyto, PCMV/myc/cyto, каждый из которых коммерчески доступен от Invitrogen Co. (Carlsbad, CA.). Примеры ретровирусного вектора и упаковочных систем продаются фирмой Clontech (San Diego, CA.) и включают в себя Retro-X векторы pLNCX и pLXSN, которые предоставляют возможность клонирования по многим сайтам, а транскрипция трансгена находится под контролем промотора цитомегаловируса. Получены векторы из Mo-MuLV, так называемые pBabe, где трансген транскрибируется под контролем промотора 5' LTR.

Рекомбинантные экспрессионные векторы данного изобретения содержат нуклеотидную последовательность данного изобретения в форме, подходящей для экспрессии в клетке-хозяине, и это означает, что рекомбинантные экспрессионные векторы включают одну или более регуляторных последовательностей для экспрессии, выбранных на основе клеток-хозяев, т.е. эти последовательности функционально связаны с экспрессируемой последовательностью. В рамках рекомбинантного экспрессионного вектора понятие "функционально связанный" означает, что интересующая нуклеотидная последовательность связана с регуляторной последовательностью (последовательностями) таким образом, что обеспечивается экспрессия нуклеотидной последовательности (например, in vitro системы транскрипции/трансляции или клеточные системы, в которых вектор вводится в клетку-хозяина).

Понятие "регуляторная последовательность" включает в себя промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования). Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel (1990), Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA. Регуляторные последовательности включают в себя последовательности, которые управляют конститутивной экспрессией нуклеотидной последовательности во многих типах клеток-хозяев, и последовательности, которые управляют экспрессией нуклеотидной последовательности только в определенном типе клеток-хозяев (например, тканеспецифичные регуляторные последовательности). Специалистам в данной области будет понятно, что создание экспрессионного вектора может зависеть от таких факторов как выбор трансформируемой клетки-хозяина или целевой уровень экспрессии белка. Экспрессионные векторы согласно изобретению могут быть введены в клетки-хозяева, для того чтобы получить таким образом белки или пептиды, включая белки слияния или пептиды, кодируемые нуклеотидными последовательностями, как описано в данном изобретении.

Рекомбинантные экспрессионные векторы согласно данному изобретению могут быть предназначены для получения различных белков в прокариотических или эукариотических клетках. Например, белки настоящего изобретения могут быть экспрессированы в бактериальных клетках, таких как Escherichia coli, клетках насекомых (например, с использованием бакуловирусных экспрессионных векторов), дрожжевых клетках или клетках млекопитающих. Подходящие типы клеток-хозяев рассматриваются в Goeddel (1990), Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA. В качестве альтернативы рекомбинантный экспрессионный вектор может транскрибироваться и транслироваться in vitro, например, с использованием T7-промоторных регуляторных последовательностей и T7-полимеразы.

Экспрессию белков в прокариотических клетках чаще всего проводят в Escherichia coli с использованием векторов, содержащих конститутивные или индуцибельные промоторы, управляющие экспрессией слитых или не слитых белков. Векторы для слитых белков добавляют ряд аминокислот с N- или C-конца к белку, кодируемому в них. Такие векторы обычно используют в трёх случаях: (I) для повышения экспрессии рекомбинантного белка; (II) для увеличения растворимости рекомбинантного белка и (III) для упрощения выделения рекомбинантного белка посредством дополнительного лиганда для аффинной очистки. Часто в экспрессионных векторах для слитых белков на стыке дополнительного полипептида и рекомбинантного белка вводят сайт протеолитического расщепления, обеспечивающий разделение рекомбинантного белка и слитого с ним фрагмента после очистки белка слияния. Такие ферменты и родственные им распознающие последовательности включают фактор Xa, тромбин, PreScission, TEV и энтерокиназу. Типичные экспрессионные векторы для слитых белков включают pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988), Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA.) и pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.), которые содержат глутатион-S-трансферазу (GST), связывающий мальтозу белок E или белок A, соответственно, для слияния с целевым рекомбинантным белком.

Необязательно, рекомбинантный экспрессионный вектор млекопитающих способен направлять экспрессию нуклеиновой кислоты в конкретном типе клеток (например, регуляторные тканеспецифичные элементы используют для экспрессии нуклеотидной последовательности). Тканеспецифичные регуляторные элементы известны в данной области. Для эффективного получения белка предпочтительно использовать нуклеотидные последовательности, кодирующие белок данного изобретения, под контролем управляющих экспрессией последовательностей, оптимизированных для экспрессии в интересующем типе клеток. Например, такие последовательности могут включать в себя оптимизированные транскрипционные и/или трансляционные регуляторные последовательности (например, измененные последовательности Козака).

Одним из подходов для достижения максимальной экспрессии рекомбинантного белка в E.coli является экспрессия белка в бактерии-хозяине с нарушенной способностью протеолитически расщеплять рекомбинантные белки. См., например, Gottesman (1990), Gene Expression Technology: Methods in Enzymology Academic Press, San Diego, CA. 185:119-128. Другой подход - это изменение нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, чтобы она была вставлена в экспрессионный вектор так, что отдельные кодоны для каждой аминокислоты являлись наиболее часто используемыми в E.coli. См., например, Wada, et al. (1992), Nucl. Acids Res. 20:2111-2118. Такое изменение нуклеотидных последовательностей данного изобретения может быть осуществлено с помощью стандартных методик синтеза ДНК. Другим подходом для решения проблемы с частотой использования кодонов является использование BL21-кодон плюс бактериальных штаммов (Invitrogen) или бактериального штамма Rosetta (Novagen); эти штаммы содержат дополнительные копии генов тРНК, редких для E.coli.

Экспрессионный вектор, кодирующий белок настоящего изобретения, может быть дрожжевым экспрессионным вектором. Примеры векторов для экспрессии в дрожжах Saccharomyces Cerevisiae включают YepSecl (Baldari, et al. (1987), EMBO J. 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz (1982), Cell, 30:933-943), pJRY88 (Schultz, et al. (1987), Gene, 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA.) и picZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA.).

Кроме того, полипептиды настоящего изобретения могут быть получены в клетках насекомых с использованием бакуловирусных экспрессионных векторов. Доступные бакуловирусные векторы для экспрессии белков в культивируемых клетках насекомых (например, в клетках Sf9) включают группу pAc (Smith, et al. (1983), Mol. Cell. Biol. 3:2156-2165) и группу pVL (Lucklow and Summers (1989), Virology, 170:31-39). В еще одном воплощении нуклеиновую кислоту данного изобретения экспрессируют в клетках млекопитающих с использованием вектора экспрессии млекопитающих. Примеры экспрессионных векторов млекопитающих включают pCDM8 (Seed (1987), Nature, 329:840) и pMT2PC (Kaufman, et al. (1987), EMBO J. 6:187-195), pIRESpuro (Clontech), pUB6 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen) pREP4 (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen). При использовании в клетках млекопитающих функции управления экспрессионным вектором часто реализуются за счет вирусных регуляторных элементов. Например, обычно используют промоторы, которые получены из полиомы, аденовируса 2, цитомегаловируса, вируса саркомы Рауса и вируса обезьян 40. О других подходящих системах экспрессии как в прокариотических, так и в эукариотических клетках см., например, в Sambrook, et al. (2001), (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory.

Клетка-хозяин может быть любой прокариотической или эукариотической клеткой. Например, белок данного изобретения может быть получен в бактериальных клетках, таких как E.coli, клетках насекомых, дрожжей, растений или клеток млекопитающих (например, клетки яичника китайского хомячка (CHO), COS, HEK293). Специалистам в данной области известны и другие клетки-хозяева.

ДНК-вектор может быть введен в прокариотические или эукариотические клетки с помощью обычных способов трансформации или трансфекции. Используемые здесь понятия "трансформация" и "трансфекция" предназначены для обозначения ряда признанных в данной области способов для введения чужеродной нуклеиновой кислоты (например, ДНК) в клетку-хозяина, включая кальций-фосфатное или кальций-хлоридное соосаждение, DEAE-декстран-опосредованную трансфекцию, липофекцию или электропорацию. Подходящие способы трансформации или трансфекции клеток-хозяев можно найти в Sambrook, et al. (2001), [Eds.] Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory и других сборниках методик.

Может быть использована любая из известных методик введения чужеродных нуклеотидных последовательностей в клетки-хозяева. Эти методики подразумевают использование кальций-фосфатной трансфекции, полибрена, слияние протопластов, электропорации, липосом, микроинъекции, плазматических векторов, вирусных векторов и любых других хорошо известных способов введения клонированной геномной ДНК, кДНК, синтетической ДНК или другого чужеродного генетического материала в клетку-хозяина. Sambrook, et al. (2001), (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory and Walker & Papley (2009), Molecular Biology and Biotechnology [5th Ed.], Royal Society of Chemistry. Необходимо, чтобы конкретная используемая генно-инженерная методика позволяла успешно вводить по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина, способную экспрессировать KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, их фрагмент или интересующий вариант.

О стабильной трансфекции клеток млекопитающих известно, что она зависит от экспрессионного вектора и способа трансфекции; лишь небольшая часть клеток может интегрировать чужеродную ДНК в свой геном. С целью выявления и отбора этих интегрантов ген, кодирующий селективный маркер (например, устойчивость к антибиотикам), обычно вводят в клетки-хозяева вместе с геном, представляющим интерес. Различные селективные маркеры включают те, что придают устойчивость к препаратам, таким как G418, гигромицин, пуромицин, бластицидин и метотрексат. Нуклеиновые кислоты, кодирующие селектируемый маркер, могут быть введены в клетку-хозяина в составе того же вектора, который кодирует белок изобретения или могут быть введены в составе отдельного вектора. Клетки, стабильно трансфицированные введенной нуклеиновой кислотой, могут быть идентифицированы путем отбора на препаратах (например, клетки, которые встроили ген селектируемого маркера, будут выживать, в то время как другие клетки погибают).

Клетка-хозяин настоящего изобретения, такая как прокариотическая или эукариотическая клетка-хозяин в культуре, может быть использована для получения (т.е. экспрессии) белка данного изобретения. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способам получения белков изобретения с использованием клеток-хозяев данного изобретения. В одном воплощении способ включает культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению (в которую был введен рекомбинантный экспрессионный вектор, кодирующий белок настоящего изобретения) в подходящей среде, которая позволяет производить белок настоящего изобретения. В другом воплощении способ дополнительно включает выделение белка данного изобретения из среды или клетки-хозяина.

После введения экспрессионного вектора трансфицированные клетки культивируют в условиях, благоприятных для экспрессии рецептора, фрагмента или интересующего варианта, который затем выделяют из культуры с использованием стандартных методик. Примеры таких способов хорошо известны в данной области. См., например, WO 00/06593.

Например, получение анти-KIR2DLl, KIR2DL2 и KIR2DL3 моноклональных антител, описанных здесь, может быть осуществлено для оптимизации процесса получения с использованием вектора, который позволяет вставлять гены и тяжелых, и легких цепей, при трансфекции клеток CHO. Плазмидный вектор pRc/CMV, который использовали, был разработан с целью достижения высокой экспрессии химерных моноклональных антител по изобретению. Этот вектор имеет сайт клонирования, по которому вводят гены тяжелых и легких цепей после CMV-промотора (цитомегаловируса человека). Вектор позволяет получать антитело в концентрации более 1000 мг/л в среде биореактора, в результате чего можно получать терапевтические дозы по 250-500 мг.

Моноклональные антитела, демонстрирующие минимальный ответ HAMA в дозах от 200 до 400 мг и получаемые каждые две недели внутривенно, могли бы быть эффективными в борьбе с метастазирующими опухолями. В настоящее время мы выбрали более новый вектор, который обеспечивает подобное введение генов тяжелых и легких цепей, но потенциально может приводить к получению более 1000 мг/л белка в среде биореактора. Оба плазмидных вектора содержат экспрессионную единицу DHFR, под контролем раннего энхансер-дефицитного промотора SV40. Вектор может быть введен в клетки CHO-D-SFM (дигидрофолатредуктаза(DHFR)-дефицитные клетки яичника китайского хомячка), находящиеся в практически бессывороточной среде с добавлением 1,0 мкг/мл метотрексата (MTX). К окончанию производства белка клетки могут быть адаптированы к бессывороточной среде перед окончательной очисткой антитела.

Антитела, связывающие KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Настоящее изобретение также обеспечивает получение антител, которые избирательно связывают KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и включают (но не ограничиваются эти списком) моноклональные и гуманизированные моноклональные антитела. Антитела, которые избирательно связывают KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут быть смешаны с фармацевтическими носителями и дополнительными агентами (например, противовоспалительными, болеутоляющими средствами или модифицирующими заболевание противоревматическими препаратами (DMARD)).

Выделенный полипептид KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, его часть или фрагмент могут быть использованы в качестве иммуногена для получения антител к KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 с использованием стандартных методик для получения поликлональных и моноклональных антител. Может быть использован как полноразмерный полипептид KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL, так и, в альтернативном варианте, данное изобретение предусматривает антигенные пептидные фрагменты KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 для использования в качестве иммуногенов. В одном из вариантов воплощения антигенный пептид KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 содержит по меньшей мере 8 аминокислотных остатков из аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 7-24, и охватывает эпитоп KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 таким образом, что антитело, полученное к пептиду, формирует специфический иммунный комплекс с полипептидом KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Предпочтительно, чтобы антигенный пептид содержал по меньшей мере 10 аминокислотных остатков, более предпочтительно по меньшей мере 15 аминокислотных остатков, еще более предпочтительно по меньшей мере 20 аминокислотных остатков, а наиболее предпочтительно по меньшей мере 30 аминокислотных остатков. Предпочтительные эпитопы, охватываемые антигенным пептидом, являются участками KIR2DL1, KIR2DL2 и

KIR2DL3, которые расположены во внеклеточном домене полипептида, например, гидрофильными участками, а также участками с высокой антигенностью.

Иммуноген KIR2DL1, KIR2DL2 или KIR2DL3 обычно используют для получения антител путем иммунизации подходящего объекта (например, кролика, козы, мыши или другого млекопитающего) иммуногеном. Соответствующий иммуногенный препарат может содержать, например, рекомбинантно экспрессированные полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или химически синтезированные полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Например, он может включать внеклеточный домен полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 (например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7-24). Препарат может дополнительно включать адъювант, такой как полный или неполный адъювант Фрейнда или подобный иммуностимулирующий агент. Иммунизация подходящего объекта иммуногенным препаратом KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 индуцирует ответ поликлональных анти-KIR2DL1, -KIR2DL2 и -KIR2DL3 антител.

Антитела могут состоять из двух одинаковых лёгких полипептидных цепей с молекулярной массой около 23000 Да ("легкая цепь") и двух одинаковых тяжелых цепей с молекулярной массой 53000-70000 Да ("тяжелая цепь"). См. Edelman (1971), Ann. NY. Acad. Sci. 190:5. Четыре цепи соединены дисульфидными мостиками в форме "Y", где легкие цепи подвешены на тяжелые цепи, начиная с угла конфигурации "Y". "Ветви" конфигурации "Y" называются Fab-фрагментом; "ствол" конфигурации "Y" называется Fc-фрагментом. Ориентация аминокислотной последовательности следующая: N-конец - в верхней части конфигурации "Y", C-конец - в нижней части каждой цепи. N-конец имеет вариабельный участок, специфичный к соответствующему антигену, и содержит около 100 аминокислот, так как существуют небольшие вариации между легкими и тяжелыми цепями от антитела к антителу.

Вариабельный участок связан в каждой цепи с константным участком, который составляет оставшуюся часть цепи, и не изменяется в рамках конкретного класса антител в зависимости от специфичности антитела (т.е. не зависит от антигена). Известно пять основных классов константных районов, определяющих класс молекулы иммуноглобулина (например, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответствующие γ, μ, α, δ, и ε константным участкам тяжелой цепи). Константный участок или класс определяет последующую эффекторную функцию антитела, включая активацию комплемента (Kabat (1976) Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry [2nd Ed.] pages 413-436; Holt, Rinehart, Winston) и другие клеточные ответы (Andrews, et al. (1980), Clinical Immunobiology, 1-18; Kohl, et al. (1983), Immunology, 48:187), в то время как вариабельный участок определяет антиген, с которым будет реагировать антитело. Легкие цепи подразделяются на κ (каппа) и λ (лямбда). Каждый класс тяжелых цепей может взаимодействовать с каппа или лямбда легкой цепью. Легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а "хвосты" двух тяжелых цепей соединены друг с другом посредством ковалентных дисульфидных связей, когда такие иммуноглобулины получены из гибридомы или B-клеток.

Для специфического связывания с антителом в определённых условиях может потребоваться антитело, отобранное по его специфичности в отношении конкретного белка. Например, поликлональные антитела, полученные к основному белку спермы от конкретных организмов, таких как крыса, мышь или человек, могут быть селектированы для получения только тех поликлональных антител, которые специфически иммунореактивны к основному белку спермы и не иммунореактивны к другим белкам, исключая полиморфные варианты и аллели основного белка спермы. Этот отбор может быть достигнут путем исключения антител, кросс-реактивных к молекулам основных белков спермы других видов. Могут быть использованы различные форматы иммунного анализа для отбора антител, специфически иммунореактивных к конкретным белкам. Например, твердофазный иммуноанализ ELISA обычно используют для отбора антител, специфически иммунореактивных к белкам. См., например, Harlow & Lane (1998), USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory для получения информации о форматах и условиях иммуноанализа, которые могут быть использованы для определения конкретной иммунореактивности. Как правило, специфичная или селективная реакция по меньшей мере в два раза превышает фоновый сигнал или шум или, что типичнее более чем в 10-100 раз.

В другом воплощении рекомбинантный экспрессионный вектор млекопитающих способен обеспечивать экспрессию нуклеиновой кислоты преимущественно в конкретном типе клеток (например, для экспрессии нуклеиновой кислоты используют тканеспецифичные регуляторные элементы). Тканеспецифичные регуляторные элементы известны в данной области. Не ограничивающиеся данным списком примеры подходящих тканеспецифичных промоторов включают промотор альбумина (специфичный для печени; Pinkert et al. (1987), Genes Dev. 1:268-277), специфичные для лимфоидных клеток промоторы (Calame and Eaton (1988), Adv. Immunol. 43:235-275), промоторы T-клеточных рецепторов (Winoto and Baltimore (1989), EMBO J. 8:729-733) и иммуноглобулинов (Baneiji et al. (1983) Cell 33:729-740; Queen and Baltimore (1983), Cell 33:741-748), нейрон-специфичные промоторы (например, промотор белка нейрофиламентов; Byrne and Ruddle (1989), Proc Natl. Acad. Sci. USA, 86:5473-5477), специфические для поджелудочной железы промоторы (Edlund et al. (1985), Science, 230:912-916) и промоторы, специфичные для молочной железы (например, промотор белка молочной сыворотки; патент США № 4873316 и европейская патентная заявка 264166). Также сюда относятся промоторы, регулируемые в процессе раз-

вития, например, промоторы мышиных Hox-генов (Kessel and Gruss (1990), Science, 249:374-379) и промотор α-фетопротеина (Campes and Tilghman (1989), Genes Dev. 3:537-546).

Поликлональные антитела.

Поликлональные антитела представляют собой гетерогенные популяции молекул антител, полученных из сыворотки животных, иммунизированных антигеном. Поликлональные антитела, которые селективно связываются с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут быть получены с помощью способов, хорошо известных в данной области. Howard & Kaser (2007), Making and Using Antibodies: A Practical Handbook CRC Press.

Моноклональные антитела.

Моноклональное антитело содержит, главным образом, гомогенную популяцию антител, специфичных к антигенам, и эта популяция содержит, главным образом, аналогичные сайты связывания эпитопов. Моноклональные антитела могут быть получены с помощью способов, известных специалистам в данной области. См., например, Kohler and Milstein (1975), Nature, 256:495-497; патент США № 4376110; Ausubel, et al. [Eds] (2011), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Assoc, and Wiley Interscience, NY; и Harlow & Lane (1998), USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory; Colligan, et al. (2005), [Eds.] Current Protocols in Immunology Greene Publishing Assoc, and Wiley Interscience, NY. Такие антитела могут относиться к любому классу иммуноглобулинов, в том числе IgG, IgM, IgE, IgA, IgD и любому другому их подклассу. Гибридома, продуцирующая антитело настоящего изобретения, может культивироваться in vitro, in situ или in vivo.

Химерные антитела.

Химерные антитела представляют собой молекулы, разные части которых получены от разных видов животных; например, эти молекулы имеют вариабельный участок, полученный из мышиного антитела, и константной участок человеческого иммуноглобулина, и используются, в основном, для снижения иммуногенности при применении и для повышения выхода при производстве антитела: например, мышиные моноклональные антитела имеют более высокие выходы в гибридомах, но и более высокую иммуногенность у человека, так что используют человеческие мышиные химерные моноклональные антитела. Химерные антитела и способы их получения известны в данной области. См. Cabilly, et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3273-3277; Morrison, et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81; 6851-6855, Boulianne, et al. (1984), Nature, 312 643-646; Neuberger, et al. (1985), Nature, 314:268-270; европейскую патентную заявку 173494 (1986); WO 86/01533 (1986); европейскую патентную заявку 184187 (1986); европейскую патентную заявку 73494 (1986); Sahagan, et al. (1986), J. Immunol. 137:1066-1074; Liu, et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:3439-3443; Sun, et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:214-218; Better, et al. (1988), Science 240:1041-1043; и Harlow & Lane (1998), USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory; патент США № 5624659.

Гуманизированные антитела.

Гуманизированные антитела сконструированы таким образом, чтобы содержать в еще большей степени человеческие иммуноглобулиновые домены, и включают встраивание в антитело только определяющих комплементарность районов животного происхождения. Эта задача может быть решена путем анализа последовательности гипервариабельных петель вариабельных участков моноклональных антител и встраивания их в структуру цепей человеческого антитела. См., например, патент США № 6187287. Кроме того, в настоящее время в данной области известны и другие способы получения гуманизированных антител. См., например, патенты США № 5225539; 5530101; 5585089; 5693762; 6054297; 6180370; 6407213; 6548,640; 6632927 и 6639055; Jones, et al. (1986), Nature, 321:522-525; Reichmann, et al. (1988), Nature, 332:323-327; Verhoeyen, et al. (1988), Science, 239:1534-36 и Zhiqiang An (2009) [Ed.] Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic John Wiley & Sons, Inc.

Фрагменты антител.

В дополнение к целым молекулам иммуноглобулинов (или их рекомбинантных аналогов) могут быть синтезированы фрагменты, содержащие сайт связывания эпитопа (например, Fab', F(ab')2 или другие фрагменты). "Фрагменты", или минимальные иммуноглобулины могут быть сконструированы с использованием способов получения рекомбинантных иммуноглобулинов. Например, "Fv" иммуноглобулины для использования в настоящем изобретении могут быть получены путем синтеза слитых вариабельных участков лёгкой и тяжёлой цепей. Комбинации антител также представляют интерес, например, диатела, которые включают две различные специфичности Fv. Антигенсвязывающие фрагменты иммуноглобулинов включают SMIP (лекарственные иммунопрепараты с малыми молекулами), верблюжьи антитела, нанотела и IgNAR, но не ограничиваются ими.

Антиидиотипические антитела.

Антиидиотипическое (анти-Id) антитело представляет собой антитело, которое распознает уникальные детерминанты, обычно связанные с антигенсвязывающим сайтом антитела. Id-антитело может быть получено путем иммунизации животного того же вида и генетического типа (например, мышиной линии), как источник антитела, антителом, к которому вырабатывается анти-Id. Иммунизированное животное будет распознавать идиотипические детерминанты иммунизирующего антитела и реагировать на них

путем синтеза антитела к этим идиотипическим детерминантам (анти-Id антитело). См., например, патент США № 4699880. Анти-Id антитело может быть также использовано в качестве "иммуногена" для индукции иммунного ответа в еще одном животном, производящем так называемое анти-анти-Id антитело. Анти-анти-Id может быть эпитопно идентично исходному антителу, которое индуцировало анти-Id. Таким образом, используя антитела к идиотипическим детерминантам антитела, можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела с идентичной специфичностью.

Сконструированные и модифицированные антитела.

Антитела настоящего изобретения дополнительно могут быть получены с использованием антитела, имеющего одну или более из V_H и/или V_L последовательностей, полученных из антитела исходного материала, для конструирования модифицированного антитела, которое может иметь изменённые свойства относительно исходного антитела. Антитела могут быть сконструированы путем модификации одного или более остатков в одном или обоих вариабельных районах (т.е. V_H и/или V_L), например, в одном или более CDR районах и/или в одном или более каркасных районах. Дополнительно или в качестве альтернативы антитела могут быть сконструированы путем модификации остатков в константном районе (районах), например, для изменения эффекторной функции (функций) антитела.

Один из вариантов изменения вариабельного участка - это перенос CDR. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно через аминокислотные остатки, расположенные в шести определяющих комплементарность районах тяжелой и легкой цепей (CDR). По этой причине аминокислотные последовательности CDR более разнообразны среди отдельных антител, чем последовательности за пределами CDR. Поскольку последовательности CDR ответственны за большинство взаимодействий антиген-антитело, то можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства определённых естественных антител, путем конструирования экспрессионных векторов, которые включают CDR последовательности конкретного природного антитела, перенесённые на каркасные последовательности из другого антитела с другими свойствами. См., например, Riechmann, et al. (1998), Nature, 332:323-327; Jones, et al. (1986), Nature, 321:522-525; Queen, et al. (1989), Proc. Natl. Acad. U.S.A. 86:10029-10033; патенты США № 5225539; 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370.

Подходящие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных источников, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК генов зародышевой линии вариабельных участков тяжелых и легких цепей человека можно найти в базе данных "Vbase" последовательностей человеческой зародышевой линии (доступно в Интернете), а также в Kabat, E. A., et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest [5th Ed.], U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, et al. (1992), "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops", J. Mol. Biol. 227:776-798 и Cox, et al. (1994), Eur. J. Immunol. 24:827-836.

Другим типом модификаций в вариабельном районе является мутация аминокислотных остатков в пределах CDR1, CDR2 и/или CDR3 районов V_H и/или V_L для улучшения одного или более свойств связывания (например, аффинности) интересующего антитела. Могут быть проведены сайт-специфичный или ПЦР-опосредованный мутагенезы, для того чтобы ввести мутацию (мутации) и повлиять на связывание антитела или другое интересующее функциональное свойство, которое может быть оценено подходящим способом in vitro или in vivo. Могут быть введены предпочтительно консервативные модификации (как описано здесь). Мутациями могут быть аминокислотные замены, вставки или делеции, но предпочтительным вариантом являются замены. Кроме того, изменяют, как правило, не более чем один, два, три, четыре или пять остатков в области CDR.

Сконструированные антитела данного изобретения включают антитела, в которые были внесены изменения каркасных остатков в пределах V_H и/или V_L, например, для улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации каркасных районов вносят для снижения иммуногенности антитела. Например, один из подходов заключается в "мутировании к первоначальному виду" одного или более каркасных остатков в соответствующей последовательности зародышевой линии. Если говорить более конкретно, то антитело, подвергшееся соматической мутации, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело. Такие остатки могут быть идентифицированы путем сравнения каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, из которой антитело получено.

Дополнительно или в качестве альтернативы к мутациям, внесенным в каркасный или CDR район, антитела данного изобретения могут быть сконструированы с применением модификации в пределах Fc-фрагмента, как правило, для того, чтобы изменить одно или более функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, связывание комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антиген-зависимую клеточную цитотоксичность. Кроме того, антитело данного изобретения может быть химически модифицировано (например, один или более химических фрагментов могут быть присоединены к антителу) или быть модифицировано для изменения его гликозилирования, также для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Такие варианты воплощения описаны ниже. Нумерация остатков в Fc-фрагменте представлена по EU-нумерации по Кабат.

Шарнирная область CH1 может быть модифицирована таким образом, что число остатков цистеина в ней изменяется, например увеличивается или уменьшается. См. патент США № 5677425. Ряд остатков цистеина в шарнирной области CH1 могут быть изменены, чтобы, например, облегчить сборку легких и тяжелых цепей или для увеличения или уменьшения стабильности антитела.

Fc-шарнирная область антитела может быть мутирована, для того чтобы уменьшить биологическое время полужизни антитела. Точнее, одна или несколько аминокислотных мутаций могут быть введены в поверхность взаимодействия CH2-CH3-доменов шарнирной области Fc-фрагмента таким образом, что это антитело снижает связывание со белком А стафилококка (SPA) в сравнении со связыванием нативного домена шарнирной области Fc-фрагмента. См., например, патент США № 6165745.

Антитело может быть модифицировано с целью увеличения его биологического времени полужизни. Возможны различные подходы. Например, может быть введена одна или несколько следующих мутаций: T252L, T254S, T256F. См. патент США № 6277375. Кроме того, для повышения биологического времени полужизни антитело может быть изменено в пределах областей C_H1 или $_{CL,}$ для того чтобы оно содержало эпитоп связывания рецептора реутилизации, полученный из двух петель домена C_H2 Fc-фрагмента IgG. См. патенты США № 5869046 и 6121022.

Fc-фрагмент может быть изменен путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, для того чтобы изменить эффекторную функцию (функции) антитела. Например, одна или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, могут быть заменены другими аминокислотными остатками, в результате чего такое антитело имеет измененное сродство к эффекторному лиганду, но сохраняет антигенсвязывающие свойства исходного антитела. Эффекторным лигандом, сродство с которым может быть изменено, может являться, например, Fc-рецептор или компонент комплемента C1. См. патенты США № 5624821 и 5648260.

Может быть изменено гликозилирование антитела. Например, может быть сделано агликозилированное антитело (т.е. антитело без гликозилирования). Гликозилирование может быть изменено, например, для того, чтобы увеличить аффинность антитела к антигену. Такие модификации углеводов могут быть осуществлены, например, при изменении одного или нескольких сайтов

гликозилирования в последовательности антитела. Например, могут быть произведены одна или несколько аминокислотных замен, что приводит к исчезновению одного или более сайтов гликозилирования каркасного района вариабельного района, за счёт чего не происходит гликозилирования в этом сайте. Такое агликозилирование может увеличить аффинность антитела к антигену. См., например, патенты США № 5714350 и 6350861.

Дополнительно или в качестве альтернативы может быть сделано антитело, которое имеет измененный тип гликозилирования, например гипофукозилированное антитело, имеющее пониженное количество остатков фукозы, или антитело, имеющее повышенное содержание бисекторных GlcNAc-структур. Было продемонстрировано, что такие изменения структур гликозилирования увеличивают ADCC-свойство антител. Такие модификации углеводов могут быть произведены, например, при экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования были описаны в данной области и могут быть использованы в качестве клеток-хозяев, в которых осуществляется экспрессия рекомбинантных антител данного изобретения, в результате чего получаются антитела с измененным гликозилированием. См. опубликованную патентную заявку США № 2004/0110704 и Yamane-Ohnuki, et al. (2004), Biotechnol Bioeng. 87:614-22; EP 1176195; WO 2003/035835; Shields, et al. (2002), J. Biol. Chem. 277: 26733-26740; WO 99/54342; Umana, et al. (1999), Nat. Biotech. 17:176-180; и Tarentino, et al. (1975), Biochem. 14:5516-23.

Антитело может быть пегилировано, например, с целью увеличения биологического времени полужизни (например, в сыворотке). Чтобы пегилировать антитело, данное антитело или его фрагмент, как правило, подвергают взаимодействию с полиэтиленгликолем (ПЭГ), например реакционноспособным сложным эфиром или альдегидом ПЭГ в таких условиях, когда одна или несколько групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. Предпочтительно, чтобы пегилирование осуществлялось посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером).

К настоящему изобретению также относятся варианты и эквиваленты, которые по существу гомологичны антителам, фрагментам антител, диателам, SMIP, верблюжьим антителам, нанотелам, IgNAR, полипептидам, вариабельным областям и CDR, описанным в данном документе. Они могут содержать, например, консервативные замены (т.е. замещение одной или нескольких аминокислот подобными аминокислотами). Например, консервативные замены относятся к заменам аминокислоты на другую в пределах того же общего класса, т.е. замене одной кислой аминокислоты на другую кислую аминокислоту, одной основной аминокислоты на другую основную аминокислоту или одной нейтральной аминокислоты на другую нейтральную аминокислоту.

Получение антител.

Моноклональные антитела, в частности, могут быть получены с использованием метода гибридом, впервые описанного Kohler, et al., Nature, 256:495 (1975), или с помощью других известных впоследствии разработанных способов (см., например, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pages 59-

103 (Academic Press, 1986)). Гибридомы и другие слитые клетки могут формироваться путем химического, электрического слияния или любым другим подходящим способом из любого подходящего типа миеломы, гетеромиеломы, фобластоидных клеток, плазмацитом или подобных иммортализованных клеток и любого подходящего типа (типов) клеток, экспрессирующих антитело.

Трансформированные иммортализованные В-клетки также могут быть использованы для эффективной выработки антитела. Трансформированные В-клетки могут быть получены с помощью стандартных методик, таких как трансформация вирусом Эпштейна-Барра 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, pages 19-33.). Таким образом, стабильные и/или иммортализованные экспрессирующие анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела клетки и клеточные линии являются еще одним признаком данного изобретения. Этап способа получения анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела может включать, например, стадию получения иммортализованных В-клеток, продуцирующих антитело, которые сливают с соответствующими партнерами для получения анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител (антитела) или секвенирования, и такие последовательности используют для получения рекомбинантного анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела.

Клеточные линии в качестве хозяев для экспрессии рекомбинантного белка хорошо известны в данной области и включают многие иммортализированные клеточные линии, доступные в American Type Culture Collection (ATCC). К ним относятся, в частности, линии клеток яичника китайского хомячка (CHO), NSO, SP2, HeLa, клеток почки детеныша хомячка (BHK), клеток почки обезьяны (COS), клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), A549, а также ряд других клеточных линий. Другие клеточные линии, которые могут быть использованы - это клеточные линии насекомых, такие как Sf9. В случае, когда в клетки вводят кодирующие антитело нуклеиновые кислоты (или нуклеотидные векторы), антитела могут быть получены путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения экспрессии антитела в клетках-хозяевах, или, что более предпочтительно, достаточного для секреции антитела в культуральную среду, в которой выращиваются клетки-хозяева. Антитела могут быть выделены из культуральной среды с использованием стандартных способов очистки белков. Антитела также могут быть извлечены из лизатов клеток-хозяев в случае, когда экспрессию проводят непосредственно без секреторного сигнала.

Очистка антител из клеточных культур, клеточных лизатов и трансгенных животных или биологических материалов, полученных из них (например, из асцитной жидкости трансгенных животных, продуцирующих антитела) может быть достигнута путем применения любого числа подходящих способов, известных в данной области, в том числе, например, способом иммуноаффинной очистки на колонке; сульфатным осаждением; хроматофокусированием; препаративным SDS-PAGE и т.д.

Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3-антитела также могут быть получены в бактериальных клетках и эукариотических одноклеточных микроорганизмах, таких как дрожжи. Антитела, полученные в бактериальных клетках, не имеют соответствующего гликозилирования и поэтому могут быть дефектными в отношении ADCC-функций и других аспектов иммунного ответа, которые наоборот могут быть, в целом, характерны для идентичных антител, продуцируемым в клетках млекопитающих и/или в животных.

Могут быть использованы подходящие способы очистки, скрининга и отбора антител, в том числе те, которые описаны в WO 2006/072625. Скрининг и отбор анти-KIR2DL1, 2 и/или 3-антител могут быть произведены любым подходящим способом или комбинацией способов. Например, могут быть использованы различные форматы иммуноанализа для отбора антител, которые избирательно связываются с конкретным белком, вариантом или фрагментом. Например, твердофазные ELISA-иммуноанализы обычно используют для отбора антител, избирательно иммунореактивных к белку, белковому варианту или фрагменту. См. Harlow and Lane, см. выше. Аффинность связывания моноклонального антитела может, например, быть определена с помощью анализа по Скэтчарду, Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3-антитела обычно подвергают скринингу на способность модулировать активность NK-клеток, например путем ингибирования KIR2DL1, 2 и/или 3-опосредованных сигналов, что способствует активации NK-клеток через NK-активирующие рецептор-опосредованные сигналы. Был разработан ряд способов анализа NK-клеток, которые могут быть полезны в подобных случаях и включают, например, скрининг способом проточной цитометрии. Смотри, например, McGinnes, et al. (1984), J. Immunol Methods, 80:70-85. Способы, относящиеся к культивированию NK-клеток, оценке NK-клеток и т.п., известны в данной области техники. См., например, Campbell and Colonna, Natural Killer Cell Protocols (Methods in Molecular Biology Series vol. 121) (2000).

Что касается анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител, то может быть продемонстрирована нейтрализующая активность NK-клеток по способности анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител восстанавливать лизис клеток-мишеней KIR2DL1, 2 и/или 3-позитивными NK-клетками. Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело, связанное с модуляцией NK-клеток (например, KIR-ингибирование), также может быть оценено с помощью различных способов клеточного анализа цитотоксичности. Перенаправление мишени является отдельной экспериментальной системой для определения способности NK-клеточного рецептора индуцировать цитотоксичность. NK-клетки, покрытые специфичным для рецептора-кандидата антителом, оценивали на

их способность убивать клетки-мишени, экспрессирующие Fc-рецептор, с которым связывается антитело. В другом варианте модуляция активности NK-клеток, связанная с анти-KIR антителом, может быть оценена с помощью анализа высвобождения цитокина. Другие виды биологической активности, связанные с различными анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителами, также могут быть использованы для оценки анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела.

Конъюгаты антител.

Антитело (или его фрагмент) может быть конъюгировано с терапевтическим агентом, таким как цитотоксин, терапевтический агент или ион радиоактивного металла. Цитотоксин или цитотоксический агент подразумевает любой агент, который является вредным для клеток. Примеры таких агентов включают таксол, цитохалазин, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи, но не ограничиваются ими. Терапевтические агенты включают антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромоманнитол, стрептозотоцин, митомицин C и цис-дихлородиаминплатину (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)) и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин), но не ограничиваются ими.

Способы конструирования антител.

Антитела, имеющие V_H- и V_L-последовательности, описанные здесь, могут быть использованы для создания нового варианта антитела путем модификации V_H- и/или V_L-последовательностей или соединённого (соединенных) с ним константного (константных) района (районов). Таким образом, структурные особенности варианта антитела данного изобретения используют для создания структурно родственных вариантов антител, сохраняющих по меньшей мере одно функциональную свойство антител данного изобретения, такое как связывание с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Например, один или несколько CDR районов одного варианта анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела или его вариантов и модификаций могут быть рекомбинантно объединены с известными каркасными районами и/или другими CDR для создания дополнительных, рекомбинантно-сконструированных анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антител (например, антител, которые связываются с KIR2DL1, KIR2DL2 и/или KIR2DL3) настоящего изобретения, как описано в данном документе. Исходным материалом для способа конструирования может быть одна или более из последовательностей V_H и/или V_L, представленных здесь, или один или более их CDR районов. Чтобы создать сконструированное антитело, нет необходимости фактически получать (т.е. экспрессировать в виде белка) антитело, содержащее одну или более последовательностей V_H и/или V_L, представленных здесь, или один или несколько их CDR-районов. Предпочтительнее использовать информацию, содержащуюся в последовательности (последовательностях), в качестве исходного материала для создания последовательности (последовательностей) "второго поколения", полученных из исходной последовательности (последовательностей), а затем получать последовательность (последовательности) "второго поколения" и экспрессировать в виде белка. Могут быть использованы стандартные молекулярно-биологические способы для получения и экспрессии изменённой последовательности антитела.

Антитело, кодируемое изменённой последовательностью (последовательностями) может сохранять одно, все или некоторые из функциональных свойств анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антител, полученных с помощью способов и последовательностей, представленных здесь, функциональные свойства которых включают связывание с вариантами KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или вариантами конъюгатов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 со специфическим значением KD или менее, и/или активность модуляции иммунных клеток и/или селективное связывание с желаемыми клетками-мишенями, такими как, например, колоректальная карцинома, рак легких, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак желудка и рак печени. Функциональные свойства измененных антител можно оценить с использованием стандартных способов, доступных в данной области и/или описанных здесь.

Мутации могут быть введены случайно или направленно во всей или части кодирующей последовательности анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антител, и полученное модифицированное анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитело может быть подвергнуто скринингу на активность связывания и/или другие желаемые функциональные свойства. См. WO 2011/120013.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, специфически связывающие KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Другой аспект изобретения относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют антитела данного изобретения, связывающиеся с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновая кислота может быть выделена путем очистки от других клеточных компонентов или других примесей (например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков) с помощью стандарт-

ных способов, включая обработку щелочью/SDS, разделение в CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие способы, хорошо известные в данной области техники. См. Ausubel, et al. (2011), Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc. Нуклеиновой кислотой данного изобретения может быть, например, ДНК или РНК, которая может как содержать, так и не содержать интронных последовательностей. Нуклеиновая кислота может представлять собой молекулу кДНК.

Нуклеиновые кислоты согласно изобретению могут быть получены с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Для антител, экспрессированных в гибридоме (например, гибридоме, полученной из трансгенных мышей, несущих гены человеческого иммуноглобулина, что описано ниже), кДНК, кодирующая легкие и тяжелые цепи антитела, полученного из гибридомы, может быть получена путем стандартной ПЦР-амплификации или способов клонировани кДНК. Для антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с использованием способов фагового дисплея), нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, может быть выделена из библиотеки.

В частности, замены вырожденных кодонов могут быть достигнуты путем создания, например, последовательности, в которой третье основание одного или нескольких выбранных кодонов замещено остатками смешанных оснований и/или дезоксиинозина. Batzer, et al. (1991), Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka, et al. (1985), J. Biol. Chem. 260:2605-08; Rossolini, et al. (1994), Mol. Cell. Probes, 8:91-98.

После того как получены фрагменты ДНК, кодирующие V_H- и V_L-районы, они могут быть дополнительно использованы в стандартных рекомбинантных методиках манипуляции с ДНК, например, для преобразования генов вариабельной области в полноразмерную цепь генов антител, генов Fab-фрагментов или генов scFv. В этих манипуляциях V_L- или V_H-кодирующий ДНК-фрагмент функционально связан с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой полипептид, такой как константная область антитела или гибкий линкер.

Выделенная ДНК, кодирующая V_H-район, может быть преобразована в ген полноразмерной тяжелой цепи путём функционального связывания V_H-кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные районы тяжелой цепи (C_H1, C_H2 и C_H3). Последовательности человеческих генов константного участка тяжелой цепи известны в данной области (см., например, Kabat, et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH
Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, соответствующие этим областям, могут быть получены путем стандартной ПЦР-амплификации. Константный район тяжелой цепи может быть константным участком IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, но наиболее предпочтительны константные области IgG1 или IgG4. Для гена Fab-фрагмента тяжелой цепи V_H-кодирующая ДНК может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только константный район тяжелой цепи C_H1.

Выделенная ДНК, кодирующая V_L-район, может быть преобразована в ген полноразмерной легкой цепи (так же в ген Fab-фрагмента легкой цепи) путём функционального связывания V_L-кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константный район легкой цепи, C_L. Последовательности человеческих генов константных районов легкой цепи известны в данной области (см., например, Kabat, et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и ДНК-фрагменты, соответствующие этим областям, могут быть получены путем стандартной ПЦР-амплификации. Константный район легкой цепи может быть каппа или лямбда константным участком, но наиболее предпочтительным является константный район каппа.

Чтобы создать ген scFv, необходимо функционально соединить V_H- и V_L-кодирующие фрагменты ДНК с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующий аминокислотную последовательность $(Gly4\text{-}Ser)_3$, такую, что последовательности V_H и V_L могут быть экспрессированы в виде непрерывного одноцепочечного белка с районами V_L и V_H, соединенными гибким линкером. См., например, Bird, et al. (1988) Science 242: 423-426; Huston, et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty, et al. (1990), Nature, 348:552-554.

Способы получения антител и их фрагментов.

Настоящее изобретение также относится к способам получения антител и их фрагментов. Способы получения антител хорошо известны специалистам в данной области. Например, способы получения химерных антител в настоящее время хорошо известны в данной области. См., например, патент США № 4816567; Morrison, et al. (1984), PNAS USA, 81:8651-55; Neuberger, et al. (1985), Nature, 314:268-270; Boulianne, et al. (1984), Nature, 312:643-46.

Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены путем генной инженерии. В этом подходе, как и в случае других способов, продуцирующие антитело клетки сенсибилизируют в отношении интересующего антигена или иммуногена. Выделенную РНК из продуцирующих антитело клеток используют в качестве матрицы для получения кДНК с помощью ПЦР-амплификации. Библиотеку векторов, каждый из которых содержит один ген тяжелой цепи и один ген легкой цепи, которые сохраняют исходную антигенную специфичность, получают путем введения соответствующих секций амплифицированной кДНК иммуноглобулина в экспрессионные векторы. Комбинаторная библиотека строится путем объединения библиотеки генов тяжелой цепи с библиотекой генов легкой цепи.

Результатом является библиотека клонов, которые совместно экспрессируют тяжелую и легкую цепь (похоже на Fab-фрагмент или фрагмент молекулы антитела, связывающий антиген). Векторами, несущими совместно эти гены, трансфицируют клетку-хозяина. Когда синтез гена антитела индуцируется в трансфицированных клетках-хозяевах, белки тяжелых и легких цепей подвергаются самосборке, в результате чего производятся активные антитела, которые могут быть обнаружены путем скрининга с антигеном или иммуногеном.

Антитела и их фрагменты согласно изобретению могут также быть получены путем конструирования с использованием обычных методик, хорошо известных специалистам в данной области; например, вектор экспрессии, содержащий оперон и последовательность ДНК, кодирующую тяжелую цепь антитела, включает, соответственно, ДНК-последовательности, кодирующие CDR, необходимые для специфичности антител, полученные из источника, отличного от клеток человека, и последовательность ДНК, кодирующую оставшиеся части цепи антитела, полученную от человеческих клеток. Кроме того, изобретение относится к векторам, особенно плазмидам, космидам, вирусам, бактериофагам и другим векторам, обычным для генной инженерии, которые содержат вышеуказанные молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения. Молекулы нуклеиновых кислот, содержащиеся в векторах, могут быть связаны с регуляторными элементами, которые обеспечивают транскрипцию в прокариотических и эукариотических клетках.

Векторы содержат элементы, которые облегчают манипуляции при экспрессии чужеродного белка в целевой клетке-хозяине. Удобным является то, что манипуляции с последовательностями и продукция ДНК для трансформации сначала выполняют в бактериальном хозяине (например, E.coli), и, как правило, векторы содержат последовательности, позволяющие облегчить такие манипуляции, в том числе бактериальную точку начала репликации и соответствующий бактериальный селективный маркер. Селективные маркеры кодируют белки, необходимые для выживания или роста трансформированных клеток-хозяев, выращиваемых в селективной культуральной среде. Клетки-хозяева, не трансформированные вектором, содержащим ген селекции, не выживают в такой культуральной среде. Типичные гены селекции кодируют белки, которые придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, дополняют ауксотрофные дефициты или снабжают необходимыми питательными веществами, недоступными в сложных средах. Типичные векторы и способы трансформации дрожжей описаны в данной области. См., например, Burke, et al. (2000), Methods in Yeast Genetics Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Интересующая последовательность, кодирующая полипептид, может быть функционально связана с регуляторными последовательностями транскрипции и трансляции, обеспечивающими экспрессию полипептида в дрожжевых клетках. Эти векторные компоненты могут включать один или несколько из следующих примеров: энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции, но не ограничиваться ими. Также могут быть задействованы последовательности для секреции полипептида (например, сигнальная последовательность).

Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", когда находится в функциональной взаимосвязи с другой нуклеотидной последовательностью. Например, ДНК сигнальной последовательности функционально связана с ДНК полипептида, если он экспрессируется в виде белка-предшественника, участвующего в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности. Как правило, понятие "функционально связанный" относится в широком смысле к смежным связанным последовательностям ДНК и, в случае секреторной лидерной последовательности, протяжённым и находящимся в рамке считывания. Однако энхансеры необязательно должны быть смежными.

Промоторы - это нетранслируемые последовательности, расположенные выше (5') стартового кодона структурного гена (обычно в пределах около 100-1000 п.о.), которые контролируют транскрипцию и трансляцию определенных последовательностей нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие промоторы делятся на несколько классов: индуцибельные, конститутивные и репрессируемые промоторы (например, которые увеличивают уровни транскрипции в ответ на отсутствие репрессора). Индуцибельные промоторы могут инициировать повышенный уровень транскрипции с ДНК, находящейся под их контролем, в ответ на некоторые изменения в условиях культивирования (например, наличие или отсутствие питательного вещества или при изменении температуры).

Второй экспрессионный вектор может быть получен с использованием тех же обычных средств, хорошо известных специалистам в данной области; этот экспрессионный вектор, содержащий оперон и последовательность ДНК, кодирующую легкую цепь антитела, содержащую, соответственно, последовательности ДНК, кодирующие CDR, необходимые для специфичности антител, полученные из источника клеток, отличных от человеческих, предпочтительно В-клеток кролика, и последовательность ДНК, кодирующую оставшиеся части цепи антитела, происходящую из источника человеческих клеток.

Экспрессионные векторы трансфицировали в клетку-хозяина с помощью методик, хорошо известных обычным специалистам в данной области техники, чтобы произвести трансфицированную клетку-хозяина; затем такую трансфицированную клетку-хозяина культивируют обычными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники для получения указанных полипептидов антител.

Клетка-хозяин может быть совместно трансфицирована двумя экспрессионными векторами, опи-

санными выше: первый экспрессионный вектор содержит ДНК, кодирующую оперон и полипептид легкой цепи, а второй вектор содержит ДНК, кодирующую оперон и полипептид тяжелой цепи. Два вектора содержат различные селективные маркеры, при этом предпочтительным является достижение, по существу, равных экспрессии полипептидов тяжелой и легкой цепей. В качестве альтернативы можно использовать один вектор, где вектор содержит ДНК, кодирующую полипептиды тяжелой и легкой цепей. Кодирующие последовательности для тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК, геномную ДНК или и то и другое.

Клетки-хозяева, используемые для экспрессии антитела и его фрагментов, могут быть либо бактериальной клеткой, такой как E.coli, или эукариотической клеткой. Для этой цели может быть использована клетка млекопитающего хорошо определенного типа, например, миеломная клетка, клетка яичника китайского хомячка (CHO), NS0 или клеточная линия HEK293.

Общие способы, с помощью которых могут быть сконструированы векторы, способы трансфекции, необходимые для получения клетки-хозяина и способы культивирования, необходимые для получения антител и их фрагментов в клетках-хозяевах, включают стандартные способы. Хотя предпочтительно, чтобы линия клеток, используемая для получения антител, являлась линией клеток млекопитающего, может быть использована любая другая подходящая клеточная линия, например бактериальная клеточная линия, такая как штамм бактерий производных E.coli или дрожжей.

Кроме того, произведённые антитела могут быть очищены в соответствии со стандартными способами данной области, такими как, например, фильтрация с поперечным течением, осаждение сульфатом аммония и аффинная хроматография на колонке.

Получение анти-KIR2DL1, 2 и 3 антител с использованием животных.

Антитела данного изобретения, которые селективно связываются с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут быть моноклональными человеческими антителами. Такие человеческие моноклональные антитела против KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут быть созданы с помощью трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих компоненты иммунной системы человека, а не мыши. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, называемых здесь как HuMAb Mouse® и KM Mouse®, соответственно, и упоминаемых здесь как "мыши с человеческими Ig". HuMAb Mouse® (Medarex. Inc.) содержит минилокус гена иммуноглобулина человека, который кодирует неизменённые последовательности тяжелых (μ, и γ) и каппа легкой цепи иммуноглобулина человека вместе с целевыми мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ и γ цепей. См., например, Lonberg, et al. (1994), Nature, 368(6474):856-859. Соответственно, мыши обнаруживают пониженную экспрессию IgM мыши или κ, и в ответ на иммунизацию трансгенные тяжелые и легкие цепи человека в них претерпевают переключение класса и соматические мутации, в результате чего образуются моноклональные человеческие IgGK с высоким сродством. Lonberg (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg and Huszar (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, и Harding and Lonberg (1995) Ann. NY. Acad. Sci. 764: 536-546. Подготовка и использование HuMab Mouse® и геномные изменения, имеющихся в этих мышах, дополнительно описаны Taylor, et al. (1992), Nucleic Acids Research, 20 6287-6295; Chen, et al. (1993), International Immunology, 5:647-656; Tuaillon, et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:3720- 3724; Choi, et al. (1993), Nature Genetics, 4:117-123; Chen, et al. (1993), EMBO J. 12:821-830; Tuaillon, et al. (1994), J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, et al. (1994), International Immunology, 6:579-591 и Fishwild, et al. (1996), Nature Biotechnology, 14:845-851. См. далее патенты США № 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; 5770429 и 5545807; WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585; WO 97/13852; WO 98/24884; WO 99/45962 и WO 01/14424.

Анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела (например, антитела, которые селективно связывают KIR2DL1, KIR2DL2 или KIR2DL3) данного изобретения могут быть получены в большем количестве с помощью мыши, которая несет последовательности человеческого иммуноглобулина на трансгенах и трансхромосомах, такой как мышь, которая несет в себе трансген человеческой тяжелой цепи и трансхромосому человеческой легкой цепи. Такие мыши, называемые здесь "KM mice®", подробно описаны в WO 02/43478.

Кроме того, в данной области доступны альтернативные трансгенные животные системы, экспрессирующие гены человеческого иммуноглобулина, которые могут быть использованы для получения анти-KIR2DLl, KIR2DL2 и KIR2DL3 антител данного изобретения. Например, могут быть использованы альтернативные трансгенные системы, называемые Xenomouse (Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в патентах США № 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963.

Кроме того, в данной области доступны альтернативные трансхромосомные животные системы, экспрессирующие гены человеческого иммуноглобулина, которые могут быть использованы для получения анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антител данного изобретения. Например, могут быть использованы мыши, несущие трансхромосомы как человеческой тяжелой цепи, так и человеческой легкой цепи и называемые "TC mice". См. Tomizuka, et al. (2000), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-727. Более того, в данной области описаны коровы, несущие трансхромосомы тяжелой и легкой цепей человека (Kuroiwa, et al. (2002), Nature Biotechnology, 20:889-894), которые могут быть использованы для получения анти-

KIR2DL1, KIR2DL2 и/или KIR2DL3 антител данного изобретения.

Человеческие моноклональные антитела данного изобретения могут быть также получены с применением способов фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулина человека. Такие способы фагового дисплея созданы в данной области для выделения человеческих антител. См., например, патенты США № 5223409; 5403484; 5571698; 5427908 5580717; 5969108; 6172197; 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081.

Человеческие моноклональные антитела данного изобретения могут быть также получены с использованием мышей со SCID, в которых иммунные клетки человека были воспроизведены таким образом, что после иммунизации может развиваться ответ человеческого антитела. См., например, патенты США № 5476996 и 5698767.

Когда используют мышей с Ig человека для получения человеческих антител данного изобретения, то они могут быть иммунизированы очищенным или обогащенным препаратом полипептида KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, как описано в Lonberg, et al. (1994), Nature, 368(6474):856-859; Fish wild, et al. (1996), Nature Biotechnology, 14:845-851; WO 98/24884 и WO 01/14424. Предпочтительно, чтобы при первом введении мыши были 6-16 недельного возраста. Например, очищенный или рекомбинантный препарат (5-50 мкг) KIR2DL1, KIR2DL2 и ICIR2DL3 может быть использован для иммунизации мышей с человеческим Ig внутрибрюшинно.

Предыдущий опыт других работ с различными антигенами показал, что трансгенные мыши реагируют, когда изначально иммунизированы внутрибрюшинно (ВБ) антигеном в полном адъюванте Фрейнда с последующей иммунизацией каждую неделю ВБ (в целом до 6) антигеном в неполном адъюванте Фрейнда. Однако адъюванты, отличные от адъюванта Фрейнда, также оказались эффективными. Кроме того, целые клетки в отсутствие адъюванта оказываются высокоиммуногенными. Иммунный ответ может контролироваться в течение курса иммунизации с помощью образцов плазмы, получаемых путем ретроорбитальных заборов крови. Плазма может быть проскринирована способом ELISA (как описано ниже), и мыши с достаточными титрами анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KER2DL3 человеческого иммуноглобулина могут быть использованы для слияния. Количество антитела в мыши может быть увеличено путём внутривенного введения антигена за 3 дня до умерщвления и удаления селезенки. Ожидается, что, возможно, необходимо выполнить 2-3 слияния для каждой иммунизации. От 6 до 24 мышей, как правило, иммунизируют для каждого антигена. Обычно используют как HCo7, так и HCo12 линии. Кроме того, как HCo7, так и HCo12 трансгены могут быть выведены в одной мыши, имеющей два разных трансгена тяжелой цепи человека (HCo7/HCo12). Альтернативно или дополнительно может быть использована линия KM Mouse®.

Создание гибридом, продуцирующих моноклональные антитела данного изобретения.

Для создания гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела данного изобретения, спленоциты и/или клетки лимфатических узлов иммунизированных мышей могут быть выделены и слиты с соответствующей иммортализированной клеточной линией, такой как линия клеток миеломы мыши. Полученные гибридомы могут быть подвергнуты скринингу на продукцию антигенспецифических антител. Например, суспензии отдельных клеток из лимфоцитов селезенки от иммунизированных мышей могут быть слиты с одной шестой частью P3X63-Ag8.653 несекретирующих клеток мышиной миеломы (ATCC, CRL 1580) в 50% PEG. Клетки могут быть посажены примерно по 2×10^{-5} в плоскодонные микротитровальные планшеты и затем две недели инкубироваться в селективной среде, содержащей 20% фетальной сыворотки, 18% "653" кондиционированной среды, 5% оригена (IGEN), 4 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия, 5 мМ HEPES, 0,055 мМ 2-меркаптоэтанола, 50 единиц/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина, 50 мг/мл гентамицина и 1x HAT (Sigma; HAT добавляется через 24 ч после слияние). Через две недели клетки можно культивировать в среде, в которой HAT заменяется на HT. Индивидуальные лунки могут быть скринированы способом ELISA для человеческих моноклональных IgM и IgG антител. После того, как начался интенсивный рост гибридомы, среду можно анализировать обычно через 10-14 дней. Гибридомы, секретирующие антитела, могут быть повторно пересажены, проскринированы, и, если по-прежнему наблюдается положительный сигнал человеческого IgG, моноклональные антитела могут быть субклонированы по меньшей мере два раза путем предельного разведения. Стабильные субклоны могут затем культивироваться in vitro для получения небольших количеств антитела в тканевой культуральной среде для его описания и характеристики.

Чтобы очистить моноклональные антитела человека, выбранные гибридомы могут быть выращены в двухлитровых вращающихся колбах для выделения моноклональных антител. Супернатанты могут быть профильтрованы и сконцентрированы перед аффинной хроматографией на сефарозе с белком A (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Элюированный IgG может быть проанализирован гель-электрофорезом и высокоэффективной жидкостной хроматографией для обеспечения чистоты. Буферный раствор может быть заменён на PBS, а концентрация может быть определена путем измерения OD280 с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела могут быть разлиты на аликвоты и храниться при -80°C.

Метки.

Антигены, антитела и их фрагменты, описанные здесь, могут быть изменены посттрансляционно при добавлении эффекторных агентов, таких как химические линкеры; детектируемых агентов, таких как, например, флуоресцентные красители, ферменты, субстраты, биолюминесцентные материалы, радиоактивные материалы, хемилюминесцентные фрагменты, цитотоксические вещества, радиоактивные материалы или функциональные фрагменты.

Широкое разнообразие объектов, например лигандов, может быть соединено с олигонуклеотидами, как известно в данной области техники. Лиганды могут включать природные молекулы или рекомбинантные или синтетические молекулы. Примерами лигандов могут быть авидин, биотин, пептиды, пептидомиметики, полилизин (PLL), полиэтиленгликоль (ПЭГ), мПЭГ, катионные группы, спермин, спермидин, полиамин, тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, сурфактант белок А, муцин, гликозилированные полиаминокислоты, трансферрин, аптамер, иммуноглобулины (например, антитела), инсулин, трансферрин, альбумин, сахар, липофильные молекулы (например, стероиды, желчные кислоты, холестерин, холевая кислота и жирные кислоты), витамин А, витамин Е, витамин К, витамин В, фолиевая кислота, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, витаминные кофакторы, липополисахариды, гормоны и рецепторы гормонов, лектины, углеводы, мультивалентные углеводы, радиоактивно меченые маркеры, флуоресцентные красители, а также их производные, но не ограничиваясь ими. См., например, патенты США № 6153 737; 6172208; 6300319; 6335434; 6335437; 6395437; 6444806; 6486308; 6525031; 6528631 и 6559 279.

Кроме того, группы могут быть добавлены к антигену или эпитопу, чтобы увеличить период полужизни in vivo (например, за счет удлинения времени выведения из крови). Такие способы включают, например, добавление ПЭГ (пегилирование) и хорошо известны в данной области. См. опубликованную заявку США № 2003/0031671.

Антиген, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные здесь, могут быть прикреплены к подложке за счет связывания с твердой меткой через специфическое химическое или физическое взаимодействие. Такое прикрепление может осуществляться посредством ковалентной связи. Тем не менее, прикрепления могут не быть ковалентными или постоянными. Материалы могут быть прикреплены к метке через "спейсерную молекулу " или "линкерную группу". Такими спейсерными молекулами являются молекулы, которые имеют один участок, прикрепляющий биологический материал, и второй участок, прикрепляющийся к метке. Таким образом, при прикреплении к метке спейсерная молекула отделяет метку и биологические материалы, но присоединяется к обоим. Способы прикрепления биологического материала (например, метки) к метке, хорошо известны в данной области и включают химическое связывание, но не ограничиваются им.

Детектируемые метки.

Анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела, описанные здесь, могут быть изменены посттрансляционно добавлением эффекторных меток (таких как химические линкеры), детектируемых меток (таких как, например, флуоресцентные красители, ферменты, субстраты, биолюминесцентные материалы, радиоактивные материалы и хемилюминесцентные метки) или функциональных меток (такие как, например, стрептавидин, авидин, биотин, цитотоксин, цитотоксический агент и радиоактивные материалы). Дальнейшие примеры ферментов включают пероксидазу хрена, ацетилхолинэстеразу, щелочную фосфатазу, (3-галактозидазу и люциферазу, но не ограничиваются ими. Дальнейшие примеры люминесцентных материалов включают родамин, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, умбеллиферон, дихлортриазиниламин, фикоэритрин и дансилхлорид, но не ограничиваются ими. Дальнейшие примеры хемилюминесцентных меток включают люминол, но не ограничиваются им. Дальнейшие примеры биолюминесцентного материалы включают люциферин, люциферазу и экворин, но не ограничиваются ими. Дальнейшие примеры радиоактивных материалов включают висмут-213 (^{213}Bi), углерод-14 (^{14}C), углерод-11 (^{11}C), хлор-18 (Cl^{18}), хром-51 (^{51}Cr), кобальт-57 (^{57}Co), кобальт-60 (^{60}Co), медь-64 (^{64}Cu), медь-67 (^{67}Cu), диспрозий-165 (^{165}Dy), эрбий-169 (^{169}Er), фтор-18 (^{18}F), галий-67 (^{67}Ga), галий-68 (^{68}Ga), германий-68 (^{68}Ge), гольмий-166 (^{166}Ho), индий-111 (^{111}In), йод-125 (^{125}I), йод-123 (^{124}I), иод-124 (^{124}I), иод-131 (^{131}I), иридий-192 (^{192}Ir), железо-59 (^{59}Fe), криптон-81 (^{81}Kr), свинец-212 (^{212}Pb), лютеций-177 (^{177}Lu), молибден-99 (^{99}Mo), азот-13 (^{13}N), кислород-15 (^{15}O), палладий-103 (^{103}Pd), фосфор-32 (^{32}P), калий-42 (^{42}K), рений-186 (^{186}Re), рений-188 (^{18S}Re), рубидий-81 (^{81}Rb), рубидий-82 (^{82}Rb), самарий-153 (^{153}Sm), селен-75 (^{75}Se), натрий-24 (^{24}Na), стронций-82 (^{82}Sr), стронций-89 (^{89}Sr), сера 35 (^{35}S), технеций-99 (^{99}Tc), таллий-201 (^{201}Tl), тритий (^{3}H), ксенон-133 (^{133}Xe), иттербий-169 (^{169}Yb), иттербий-177 (^{177}Yb) и иттрий-90 (^{90}Y).

Цитотоксические агенты.

Анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела, описанные здесь, могут быть конъюгированы с цитотоксическими агентами, включающими метотрексат, аминоптерин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин; алкилирующими агентами, такими как мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), митомицин С, ломустин (CCNU), 1-метилнитрозомочевина, циклофосфамид, мехлорэтамин, бусульфан, дибромманнитол, стрептозотоцин, митомицин С, цисдихлородиаминплатину(II) (DDP), цисплатин и карбоплатин (параплатин); антрациклинами, включаю-

щими даунорубицин (ранее дауномицин), доксорубицин (адриамицин), деторубицин, карминомицин, идаруцибин, эпирубицин, митоксантрон и бисантрен; антибиотиками, включающими дактиномицин (актиномицин D), блеомицин, калихеамицин, митрамицин и антрамицин (AMC); и антимитотическими агентами, такими как алкалоиды барвинка, винкристин и винбластин, но не ограничиваясь ими. Другие цитотоксические агенты включают паклитаксел (Таксол®), рицин, экзотоксин псевдомонады, гемцитабин, цитохалазин, грамицидин D, бромид этидия, эметин, этопозид, тенопозид, колхицин, дигидроксиантрациндион, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пуромицин, прокарбазин, гидроксимочевину, аспарагиназу, кортикостероиды, митотан (O,P'-(DDD)), интерфероны, а также смеси этих цитотоксических агентов.

Следующие цитотоксические агенты включают химиотерапевтические агенты, такие как карбоплатин, цисплатин, паклитаксел, гемцитабин, калихеамицин, доксорубицин, 5-фторурацил, митомицин C, актиномицин D, циклофосфамид, винкристин, блеомицин, VEGF-антагонисты, EGFR-антагонисты, платины, таксолы, иринотекан, 5-фторурацил, гемцитабин, лейковорин, стероиды, циклофосфамид, мелфалан, алкалоиды барвинка (например, винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин), мустины, ингибиторы тирозинкиназы, лучевую терапию, антагонисты половых гормонов, селективные модуляторы рецептора андрогена, селективные модуляторы рецептора эстрогена, PDGF-антагонисты, антагонисты ФНО, IL-1-антагонисты, интерлейкины (например, IL-12 или IL-2), IL-12R-антагонисты, Эрбитукс®, Авастин®, Пертузумаб, анти-CD20 антитела, Ритуксан®, окрелизумаб, офатумумаб, DXL625, Герцептин® или любую их комбинацию, но не ограничиваясь ими. Токсичные ферменты растений и бактерий, такие как рицин, дифтерийный токсин и токсин псевдомонады могут быть конъюгированы с гуманизированными антителами или их связывающими фрагментами для создания цитоспецифичных уничтожающих реагентов. Youle, et al. (1980), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 77:5483; Gilliland, et al. (1980), Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77:4539; Krolick, et al. (1980), Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77:5419. Другие цитотоксические агенты включают цитотоксические рибонуклеазы. См. патент США № 6653104.

Анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела, описанные здесь, могут быть конъюгированы с радионуклидом, который испускает альфа- или бета-частицы (например, радиоиммуноконъюгаты). Такие радиоактивные изотопы включают бета-излучатели, таких как фосфор-32 (^{32}P), скандий-47 (^{47}Sc), медь-67 (^{67}Cu), галий-67 (^{67}Ga), иттрий-88 (^{88}Y), иттрий-90 (^{90}Y), йод-125 (^{125}I), йод-131 (^{131}I), самарий-153 (^{153}Sm), лютеций-177 (^{177}Lu), рений-186 (^{186}Re), рений-188 (^{188}Re), и альфа-излучатели, такие как астат-211 (^{211}At), свинец-212 (^{212}Pb), висмут-212 (^{212}Bi), висмут-213 (^{213}Bi) или актиний-225 (^{225}Ac), но не ограничиваются ими.

В данной области известны способы для конъюгации KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, описанных здесь, с меткой, например, способы, описанные Hunter, et al. (1962), Nature, 144:945; David, et al. (1974), Biochemistry, 13:1014; Pain, et al. (1981), J. Immunol. Meth. 40:219 и Nygren (1982), Histochem and Cytochem, 30:407.

Подложки.

Анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела, описанные здесь, могут быть прикреплены к субстрату (подложке). Ряд субстратов (например, твердые носители), известных в данной области, пригоден для использования с анти-KIR2DLl, KIR2DL2 и KIR2DL3 антителами, описанными в данном документе. Подложка может быть модифицирована, для того чтобы в ней были каналы или другие структуры. См. Fung (2004) [Ed.] Protein Arrays: Methods and Protocols Humana Press и Kambhampati (2004) [Ed.] Protein Microarray Technology John Wiley & Sons.

Материалы подложки включают акрилы, агарозу, боросиликатное стекло, углерод (например, углеродные нановолоконистые листы или гранулы), ацетат целлюлозы, целлюлозу, керамику, стекло, гели (например, неорганические, с контролируемыми порами, модифицированные, натриево-кальциевые или функционализированное стекло), латекс, магнитные бусины, мембраны, металл, металлоиды, нитроцеллюлозу, NYLON®, оптоволоконные пучки, органические полимеры, бумагу, пластик, полиакрилоилморфолид, поли-4-метилбутен, полиэтилентерефталат, поливинилбутират, полиакриламид, полибутилен, поликарбонат, полиэтилен, терефталатполиэтиленгликоль, полиформальдегид, полиметакрилат, полиметилметакрилат, полипропилен, полисахариды, полистирол, полиуретаны, поливинилацетат, поливинилхлорид, поливинилидендифторид (ПВДФ), поливинилпирролидон, вискозу, смолы, каучуки, полупроводниковые материалы, сефарозу®, диоксид кремния, кремний, сополимеры стирола, TEFLON® и множество других полимеров, но не ограничиваются ими.

Подложки не обязательно должны быть плоскими и могут включать в себя любой тип структуры, включая сферические формы (например, бусины) или цилиндрические формы (например, волокна). Материалы, присоединенные к твердым подложкам, могут быть прикреплены к любой части твердой подложки (например, могут быть прикреплены к внутренней части пористой твердой подложки).

Форма подложки может быть в виде бусины, коробки, колонки, цилиндра, диска, чашки (например, стеклянные чашки, чашки Петри), волокна, пленки, фильтра, планшета для микротитрования (например, 96-луночный микротитровальный планшет), мультилопастного стержня, сети, гранулы, пластины, кольца, штанги, рулона, листа, слайда, стержня, подноса, пробирки или флакона. Подложка может быть осо-

бой отдельной структурой (например, одной пробиркой, одной бусиной), любым количеством множества структур подложек (например, ряды из 10 пробирок, нескольких бусин) или их комбинацией (например, поднос состоит из множества микротитровальных планшетов, колонок, заполненных бусинами, микротитровальных планшетов с бусинами).

Анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитело может быть "прикреплено" к подложке, когда оно связано с твердой подложкой посредством неслучайного химического или физического взаимодействия. Такое прикрепление может осуществляться посредством ковалентной связи. Тем не менее прикрепления необязательно должны быть ковалентными или постоянными. Материалы могут быть прикреплены к подложке посредством "спейсерной молекулы" или "линкерной группы". Такие спейсерные молекулы являются молекулами, которые имеют один участок, который прикрепляет биологический материал, и второй участок, который прикрепляется к подложке. Таким образом, при прикреплении к субстрату спейсерная молекула разделяет подложку и биологические материалы, но прикреплена к обоим. Способы прикрепления биологического материала (например, метки) к подложке хорошо известны в данной области и включают химическое связывание, но не ограничиваются им.

Могут быть использованы планшеты, такие как микротитровальные планшеты, поддерживающие и содержащие твёрдую фазу для твердофазных синтетических реакций. Планшеты для микротитрования могут вмещать бусины, которые используют в качестве твердой фазы. Под "частицами", или "микрочастицами", или "наночастицами", или "бусинами", или "микробусинами", или "микросферами" здесь подразумеваются микрочастицы, имеющие любые форму или размер. Форма может быть, в общем, сферической, но необязательно должна быть сферической, являясь, например, цилиндрической или многогранной. Специалистам в данной области будет понятно, что частицы могут состоять из широкого ряда материалов в зависимости от их назначения, включая поперечно сшитый крахмал, декстраны, целлюлозу, белки, органические полимеры, в том числе полимеры стирола, такие как полистирол и метилстирол, а также другие стирольные сополимеры, пластмассы, стекло, керамику, акриловые полимеры, магнитореагирующие материалы, коллоиды, ториазол, графит, двуокись титана, нейлон, латекс и TEFLON® (но не ограничиваясь ими). См., например, "Microsphere Detection Guide" from Bangs Laboratories, Fishers, IN.

Анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела, описанные здесь, могут быть присоединены к субстратам любых форм, описанных здесь (например, бусина, коробка, колонка, цилиндр, диск, чашка (например, стеклянная чашка, чашка Петри), волокно, пленка, фильтр, микротитровальный планшет (например, 96-луночный микротитровальный планшет), мульти-лопастной стержень, сеть, гранулы, пластины, кольца, штанги, рулон, лист, слайд, стержень, поднос, пробирка или флакон). В частности, частицы или гранулы могут быть составной частью гелеобразующего материала или могут быть отдельными компонентами, такими как латексные бусины, изготовленные из различных синтетических пластмасс (например, полистирол). Метка (например, стрептавидин) может быть связана с подложкой (например, бусиной).

Фармацевтические композиции.

Понятие "фармацевтическая композиция" относится к химической или биологической композиции, подходящей для введения млекопитающему. Такие композиции могут быть специально приготовлены для введения посредством одного или более способов, включая буккальный, накожный, эпидуральный, ингаляционный, внутриартериальный, внутрисердечный, интрацеребровентрикулярный, внутрикожный, внутримышечный, интраназальный, внутриглазной, внутрибрюшинный, интраспинальный, интратекальный, внутривенный, пероральный, парентеральный, ректальный через клизмы или суппозитории, подкожный, субдермальный, сублингвальный, трансдермальный и трансслизистый способ, но не ограничиваясь ими. Кроме того, введение может осуществляться с помощью инъекций, порошка, жидкости, геля, капель или другими средствами введения.

Понятия "фармацевтический наполнитель" или "фармацевтически приемлемый наполнитель" подразумевают носитель, обычно жидкость, с которым активный терапевтический агент смешан. В одном воплощении изобретения активный терапевтический агент представляет собой гуманизированное антитело, описанное здесь, или один или несколько его фрагментов. Наполнитель обычно не обладает никакой фармакологической активностью при смешивании, хотя может обеспечить химическую и/или биологическую устойчивость и некоторые свойства высвобождения. Примеры композиций могут быть найдены, например, в Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21st Ed.].

Фармацевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях получения и хранения. Изобретение предполагает, что фармацевтическая композиция присутствует в лиофилизированной форме. Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосом или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Кроме того, изобретение предусматривает включение стабилизатора в фармацевтическую композицию.

Анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела, описанные здесь, могут быть приготовлены в виде фармацевтических композиций различных форм дозировки. Для получения фармацевтических компози-

ций по изобретению по меньшей мере один из KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в качестве активного ингредиента может быть тщательно смешан с соответствующим носителем и добавками в соответствии с методиками, хорошо известными специалистам в области фармацевтических препаратов. См. Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21st Ed.]. Например, антитела, описанные здесь, могут быть приготовлены в фосфатно-солевом буфере с pH 7,2 и поставляться в виде прозрачного бесцветного жидкого раствора с концентрацией 5,0 мг/мл.

Кроме того, композиции для жидких препаратов включают растворы, эмульсии, дисперсии, суспензии, сиропы и эликсиры с подходящими носителями и добавками, включая воду, спирты, масла, гликоли, консерванты, ароматизаторы, красители и суспендирующие агенты, но не ограничиваясь ими. Типичные препараты для парентерального введения включают активный ингредиент с носителем, таким как стерильная вода или парентерально приемлемое масло, включая полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, лецитин, арахисовое масло или кунжутное масло, но не ограничиваясь ими; могут быть также включены другие добавки, способствующие растворению или сохранению. Что касается раствора, то он может быть лиофилизирован в порошок, а затем восстановлен непосредственно перед использованием. Для дисперсий и суспензий соответствующие носители и добавки включают водные камеди, целлюлозы, силикаты или масла.

Каждый из указанных вариантов анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антител, описанных здесь, может быть введен в виде различных дозированных форм. Любая биологически приемлемая лекарственная форма известна лицам с обычной квалификацией в данной области, также предусмотрены их комбинации. Примеры таких дозированных форм включают без ограничения восстанавливаемые порошки, эликсиры, жидкости, растворы, суспензии, эмульсии, порошки, гранулы, частицы, микрочастицы, диспергируемые гранулы, капсулы, средства для ингаляции, аэрозоли для ингаляции, пластыри, средства для ингаляции частиц, имплантаты, депо-имплантаты, инъекции (в том числе подкожные, внутримышечные, внутривенные и внутрикожные), инфузии и их комбинации.

Во многих случаях будет предпочтительным включать в композиции изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Продолжительное всасывание инъекционных композиций может быть вызвано включением в состав агента, который задерживает абсорбцию, например солей моностеарата и желатина. Кроме того, соединения, описанные здесь, могут быть приготовлены в виде композиций с высвобождением, зависимым от времени, например в виде композиции, которая включает полимер, замедляющий высвобождение. Анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела, описанные здесь, могут быть получены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, например, для композиций с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биодеградируемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота и сополимеры полимолочной и полигликолевой кислот (PLG). Многие способы получения таких композиций известны специалистам в данной области.

Дополнительные активные соединения могут быть также введены в композиции.

Как отмечалось, такие композиции могут дополнительно содержать нужный антиген, например опухолевый антиген или другие иммуномодулирующие соединения, такие как антагонисты Toll-подобного рецептора, интерферон типа 1, такой как альфа- и бета-интерфероны, и CD40-агонисты, такие как агонистические CD40-антитела и фрагменты антител, предпочтительно агонистические анти-CD40-антитела человека и фрагменты таких антител, или другие иммунные усилители или супрессоры, такие как белки слияния PD-L1, PD-L2, CTLA4 и антитела, специфичные к ним.

Композиции, содержащие анти-KIR2DLl, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела, описанные здесь, могут дополнительно содержать антиген или другой иммунный агонист. Антиген можно вводить в количестве, которое в сочетании с другими компонентами комбинации является эффективным для получения иммунного ответа против антигена. Например, антиген может быть введен в количестве от около 100 мкг/кг до около 100 мг/кг. В некоторых вариантах воплощения антиген может быть введен в количестве от около 10 мкг/кг до около 10 мг/кг. В некоторых вариантах воплощения антиген может быть введен в количестве от около 1 до около 5 мг/кг. Конкретное количество антигена, которое представляет собой количество, эффективное для вызывания иммунного ответа, однако, зависит до некоторой степени от определенных факторов, таких как, например, введение конкретного антигена; введение конкретного агониста и его количества; состояние иммунной системы; способ и порядок введения агониста и антигена; вид, которому вводят композицию, и желаемый терапевтический результат. Соответственно, не практично заранее устанавливать среднее количество, которое представляет собой эффективное количество антигена. Специалисты в данной области техники, однако, могут легко определить соответствующее количество с учетом таких факторов.

Фармацевтически приемлемые носители.

Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела можно комбинировать с одним или несколькими носителями (разбавителями, наполнителями и т. п.) и/или адъювантами, подходящими для одного или более намеченных путей введения, чтобы обеспечить композиции, являющиеся фармацевтически приемлемыми.

Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела могут быть, например, смешаны с лактозой, сахарозой, порошками (например, порошком крахмала), сложными эфирами целлюлозы и алкановых кислот, стеариновой кислотой, тальком, стеаратом магния, оксидом магния, натриевыми и кальциевыми солями фосфорной и серной кислот, камедями, желатином, альгинатом натрия, поливинилпирролидоном и/или поливиниловым спиртом и, что не является обязательным, дополнительно таблетированы или инкапсулированы для обычного введения. Кроме того, анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело может быть растворено в физиологическом растворе, воде, полиэтиленгликоле, пропиленгликоле, коллоидном растворе карбоксиметилцеллюлозы, этаноле, кукурузном масле, арахисовом масле, хлопковом масле, кунжутном масле, трагаканте и/или различных буферах. Другие носители, адъюванты и способы введения хорошо известны в области фармацевтики. Носитель или разбавитель может включать материал задержки высвобождения, такой как глицерилмоностеарат или глицериндистеарат, отдельно или с воском или другими функционально подобными материалами.

Фармацевтически приемлемые носители обычно включают в себя любые и все подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие всасывание агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми с анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителами. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают воду, физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор, декстрозу, глицерин, этанол и т.п., а также комбинации любых из них. Во многих случаях может быть желательным включать в такие композиции изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые вещества, такие как смачивающие агенты или небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие агенты или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, способны повысить срок годности или эффективность анти-KIR антитела, его композиции или комбинации. Пригодность носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяется на основании отсутствия существенного негативного влияния на желаемые биологические свойства антитела.

Композиции анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител, близкие композиции и комбинации в соответствии с изобретением могут существовать в различных пригодных формах. Такие формы включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, для инъекций и инфузий), 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. Композиции, соли более подробно описаны в WO 2006/072625.

Как правило, композиции в форме инъекций или растворов для инфузий, такие как композиции, аналогичные тем, которые используют для пассивной иммунизации людей другими антителами, используют для доставки анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител данного изобретения. Типичный режим для доставки анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 композиций антител - это парентеральное введение (например, внутривенное, подкожное, внутрибрюшинное и/или внутримышечное введение). В одном аспекте анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела вводят пациенту путем внутривенной инфузий или инъекции.

Композиция для фармацевтического применения может также включать различные разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионный детергент, такой как Твин-80), стабилизаторы (например, сахара или свободные от белка аминокислоты), консерванты, фиксирующие ткани вещества, растворители и/или другие материалы, пригодные для включения в композиции для использования в фармацевтических целях. Примеры подходящих компонентов также описаны,

например, в Berge etal., J. Pharm. Sci., 6661, 1-19 (1977); Wang and Hanson, J. Parenteral. Sci. Tech: 42, S4-S6 (1988); патенты США №№ 6,165,779 и 6,225,289. Такая фармацевтическая композиция может также включать консерванты, антиоксиданты или другие добавки, известные специалистам в данной области. Дополнительные фармацевтически приемлемые носители хорошо известны в данной области техники. См., например, ссылки в WO 2006/072625.

Специалист в данной области техники будет способен определить эффективную дозировку и частоту введения посредством рутинных экспериментов, например, следуя данному описанию и руководству Goodman, et al. (2011), Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics [12 Ed.]; Howland, et al. (2005,) Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology [2nd Ed.]; и Golan, (2008), Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy [2nd Ed.]. См., также, Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21st Ed.].

Пути введения.

Описанные здесь композиции могут быть введены любым из следующих путей: буккальным, накожным, эпидуральным, инфузией, ингаляцией, внутриартериальным, внутрисердечным, интрацеребровентрикулярным, внутрикожным, внутримышечным, интраназальным, внутриглазным, внутрибрюшинным, интраспинальным, внутриоболочечным, внутривенным, пероральным, парентеральным, легочным, ректальным через клизмы или суппозитории, подкожным, субдермальным, сублингвальным, трансдермальным и трансслизистым. Предпочтительными способами введения являются внутривенные инъекции или инфузии. Введение может быть локальным, где композицию вводят напрямую, рядом, локально,

близко, около, в область или в непосредственной близости от очага заболевания, например локализованного, или системным, при котором композицию дают пациенту, и она проходит через тело в значительной степени, тем самым достигая очага (очагов) болезни. Местное введение (например, инъекции) может быть достигнуто путем введения в клетку, ткань, орган, и/или систему органов, которые охвачены и/или пострадали от этого заболевания, и/или где признаки и/или симптомы болезни активны, или могут возникнуть (например, локализация опухоли). Введение может быть локальным с местным действием: композицию наносят непосредственно там, где её действие необходимо (например, очаг воспаления или боли).

Для каждого из указанных вариантов воплощения соединения можно вводить в различных дозированных формах, известных в данной области. Любая биологически приемлемая дозированная форма известна лицам с обычной квалификацией в данной области, также предусмотрены комбинации форм. Примеры таких дозированных форм включают без ограничения жевательные таблетки, быстрорастворимые таблетки, шипучие таблетки, восстанавливаемые порошки, эликсиры, жидкости, растворы, суспензии, эмульсии, таблетки, многослойные таблетки, двухслойные таблетки, таблетки в виде капсул, мягкие желатиновые капсулы, твердые желатиновые капсулы, капсулы, пастилки, жевательные пастилки, бусины, порошки, камеди, гранулы, частицы, микрочастицы, диспергируемые гранулы, крахмальные капсулы, средства для спринцевания, суппозитории, кремы, локальное применение, средства для ингаляции, аэрозоли для ингаляции, пластыри, средства для ингаляции частиц, имплантаты, депо-имплантаты, средства для проглатывания, инъекции (включая подкожные, внутримышечные, внутривенные и внутрикожные), инфузии и их комбинации.

Другими веществами, которые могут быть включены путем смешивания, являются, например, с медицинской точки инертные ингредиенты (например, твердые и жидкие разбавители), такие как лактоза, декстроза, сахароза, целлюлоза, крахмал или фосфат кальция для таблеток или капсул, оливковое масло или этилолеат для мягких капсул, и вода или растительное масло для суспензий или эмульсий; смазывающие агенты, такие как диоксид кремния, тальк, стеариновая кислота, стеарат магния или кальция и/или полиэтиленгликоли; гелеобразующие агенты, такие как коллоидные глины; загустители, такие как трагакантовая камедь или альгинат натрия; связующие агенты, такие как крахмалы, гуммиарабик, желатин, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза или поливинилпирролидон; дезинтегрирующие агенты, такие как крахмал, альгиновая кислота, альгинаты или натрийкрахмалгликолат; шипучие смеси; красители; подсластители, смачивающие агенты, такие как лецитин, полисорбаты или лаурилсульфаты; и другие терапевтически приемлемые вспомогательные ингредиенты, такие как увлажнители, консерванты, буферы и антиоксиданты, которые являются известными добавками для таких композиций.

Жидкие дисперсии для перорального введения могут быть сиропами, эмульсиями, растворами или суспензиями. Сиропы могут содержать в качестве носителя, например, сахарозу или сахарозу с глицерином, и/или маннитом, и/или сорбитом. Суспензии и эмульсии могут содержать носитель, например природную смолу, агар, альгинат натрия, пектин, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу или поливиниловый спирт.

В других вариантах воплощения настоящее изобретение относится к наборам, включающим один или более контейнеров, содержащих фармацевтические дозированные единицы, содержащие эффективное количество одного или более антител и их фрагментов настоящего изобретения. Наборы могут включать в себя инструкции, указания, этикетки, маркетинговую информацию, предупреждения или информационные брошюры.

Дозы.

Количество анти-KIR2DLl, KIR2DL2 и KIR2DL3 антител, описанных здесь в терапевтической композиции, согласно любому из вариантов воплощения настоящего изобретения может изменяться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол, вес, история болезни пациента, факторы риска, предрасположенность к болезни, пути введения, уже существующая схема лечения (например, возможные взаимодействия с другими лекарственными препаратами) и вес человека. Схемы дозирования лекарственного средства можно регулировать для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Например, может быть введен один болюс, может быть введено несколько отдельных доз в течение времени или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена согласно конкретной терапевтической ситуации.

Особенно предпочтительно составлять парентеральные композиции в единичной дозированной форме для простоты введения и однородности дозировки. Единичная дозированная форма, используемая здесь, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для субъектов-млекопитающих, подвергающихся лечению; каждая единица содержит предварительно определенное количество антител и их фрагментов, рассчитанное на получение желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Состав дозированных формы согласно изобретению определяется и непосредственно зависит от уникальных характеристик антител и их фрагментов и определенного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и ограничений, присущих в данной области техники для получения таких антител и их фрагментов для лечения чувствительности субъектов. При терапевтическом применении для лечения состояний у млекопитающих (на-

пример, человека), для которых антитела и их фрагменты данного изобретения или их подходящая фармацевтическая композиция являются эффективными, антитела и их фрагменты данного изобретения могут быть введены в эффективном количестве.

Дозировки, пригодные для настоящего изобретения, могут представлять собой композицию, фармацевтическую композицию или любые другие композиции, описанные здесь.

Доза может быть введена в виде разовой дозы, двойной дозы, тройной дозы, четырехкратной дозы и/или пятикратной дозы. Дозы можно вводить по отдельности, одновременно и последовательно.

Дозированная форма может быть любой формы высвобождения, известной обычным специалистам в данной области техники. Композиции настоящего изобретения могут быть составлены так, чтобы обеспечить немедленное высвобождение активного ингредиента или постоянное, или контролируемое высвобождение активного ингредиента. В случае замедленного высвобождения или контролируемого высвобождения высвобождение активного ингредиента может происходить с такой скоростью, что уровень в крови поддерживается в пределах терапевтического диапазона, но ниже токсических уровней в течение длительного периода времени (например, от 4 до 24 ч). Предпочтительные лекарственные формы включают формы немедленного освобождения, замедленного высвобождения, импульсного высвобождения, переменного высвобождения, контролируемого высвобождения, регулируемого по времени высвобождения, постоянного высвобождения, отсроченного высвобождения, длительного действия и их комбинации, как известно в данной области.

Как определено здесь, терапевтически эффективное количество белка или полипептида (например, эффективная доза) находится в пределах от около 0,001 до 30 мг/кг веса тела, предпочтительно около от 0,01 до 25 мг/кг веса тела, более предпочтительно около от 0,1 до 20 мг/кг веса тела, и еще более предпочтительно от около 1 до 10 мг/кг, от 2 до 9 мг/кг, от 3 до 8 мг/кг, от 4 до 7 мг/кг или от 5 до 6 мг/кг веса тела. Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозу, необходимую для эффективного лечения субъекта, в том числе тяжесть заболевания или расстройства, предшествующее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие присутствующие заболевания, но не ограничиваясь ими. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством белка, полипептида или антитела может включать в себя однократную процедуру или, что предпочтительнее, может включать в себя ряд процедур.

В предпочтительном случае субъекта лечат антителом, белком или полипептидом в диапазоне около от 0,1 до 20 мг/кг веса тела один раз в неделю в течение около от 1 до 10 недель, предпочтительно в течение от 2 до 8 недель, более предпочтительно в течение около от 3 до 7 недель и еще более предпочтительно в течение около 4, 5 или 6 недель. Следует также иметь в виду, что эффективная доза антитела, белка или полипептида, используемого для лечения, может увеличиваться или уменьшаться в течение конкретного процесса лечения. Изменения в дозировке могут привести стать результатом и станут очевидными из результатов диагностических анализов, описанных в данном документе.

Следует иметь в виду, что фармакологическую активность композиций можно контролировать при помощи стандартных фармакологических моделей, которые известны в данной области. Кроме того, следует иметь в виду, что композиции, содержащие анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, могут быть включены или инкапсулированы в подходящей полимерной матрице или мембране для сайт-специфической доставки или могут быть функционализированы конкретными нацеливающими агентами, способными осуществлять сайт-специфическую доставку. Эти способы, а также другие способы доставки лекарств хорошо известны в данной области. Определение оптимальных доз для конкретной ситуации находится в пределах возможностей специалистов в данной области техники. См., например, Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21st Ed.].

Лечение воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

Настоящее изобретение относится к терапевтическим способам лечения или профилактики воспалительного или аутоиммунного расстройства у лиц, имеющих воспалительное или аутоиммунное расстройство или предрасположенных к таким расстройствам, при которых лечение включает в себя композиции анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител и/или схожие композиции.

Например, повышенные уровни экспрессии KIR2DL2 были зарегистрированы у пациента, страдающего от воспалительных заболеваний кишечника (IBD) и болезни Крона. См. Wilson, et al. (2010), Human Immunol. 71(3):293-7.

KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела, описанные здесь, могут быть использованы в композициях, применениях и способах лечения опосредованных Т-клетками воспалительных и аутоиммунных заболеваний, таких как волчанка, гранулематоз Вегенера, аутоиммунный гепатит, болезнь Крона, склеродермия, язвенный колит, синдром Шегрена, увеит, сахарный диабет 1 типа, миокардит, ревматизм, анкилозирующий спондилоартрит, ревматоидный артрит, рассеянный склероз или псориаз.

KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела, описанные здесь, могут быть использованы в композициях, применениях и способах лечения аутоиммунных заболеваний или расстройств. Примеры аутоиммунных заболеваний или расстройств включают, но не ограничиваются, такие заболевания, как синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), приобретенная атрофия поджелудочной железы, острый передний увеит,

острый рассеянный энцефаломиелит, острый подагрический артрит, острый геморрагический некротический лейкоэнцефалит, острый или хронический синусит, острый гнойный менингит (или другие воспалительные заболевания центральной нервной системы), острое тяжелое воспаление, болезнь Аддисона, адреналит, сахарный диабет, развивающийся у взрослых (диабет II типа), идиопатический гипопаратиреоз, развивающийся у взрослых (AOIH), агаммаглобулинемия, агранулоцитоз, васкулиты (включая васкулит больших сосудов (в том числе ревматическая полимиалгия и артрит гигантских клеток (артрит Такаясу)), аллергические состояния, аллергический контактный дерматит, аллергический дерматит, аллергический гранулематозный васкулит, аллергическая гиперчувствительность, аллергический неврит, аллергические реакции, гнездная алопеция, тотальная алопеция, синдром Альпорта, альвеолит (например, аллергический альвеолит и фиброзирующий альвеолит), болезнь Альцгеймера, амилоидоз, амилотрофический боковой склероз (АБС, болезнь Лу Геринга), расстройства, связанные с эозинофилами (например, эозинофилия), анафилаксия, болезнь Бехтерева, ангиэктазия, антитело-опосредованный нефрит, анти-GBM/анти-TBM нефрит, комплекс антиген-антитело-опосредованные заболевания, синдром Гудпасчера, синдром антифосфолипидных антител, антифосфолипидный синдром (АФС), афты, афтозный стоматит, апластическая анемия, аритмия, атеросклероз, атеросклеротические расстройства, артрит (например, ревматоидный артрит, такой как острый артрит, хронический ревматоидный артрит), хронический прогрессирующий артрит, деформирующий артрит, аскаридоз, аспергиллома (или гранулемы, содержащие эозинофилы), аспергиллез, аспермиогенез, астма (например, бронхиальная астма, а также аутоиммунная астма), атаксия-телеангиэктазия, атаксический склероз, атеросклероз, аутизм, аутоиммунные ангионевротический отек, аутоиммунная апластическая анемия, аутоиммунный атрофический гастрит, аутоиммунный диабет, аутоиммунное заболевание яичек и яичников, включая аутоиммунный орхит и оофорит, аутоиммунные расстройства синтеза коллагена, аутоиммунная вегетативная дистония, аутоиммунные заболевания уха (например, аутоиммунные заболевания внутреннего уха (AGED)), аутоиммунные эндокринные заболевания, включая тиреоидит, такой как аутоиммунный тиреоидит, аутоиммунная энтеропатия, аутоиммунная дисфункция половых желез, аутоиммунная потеря слуха, аутоиммунный гемолиз, аутоиммунный гепатит, аутоиммунные гепатологические расстройства, аутоиммунная гиперлипидемия, аутоиммунный иммунодефицит, аутоиммунные заболевания внутреннего уха (AIED), аутоиммунный миокардит, аутоиммунная нейтропения, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунная полиэндокринопатия, аутоиммунный полигландулярный синдром I типа, аутоиммунная ретинопатия, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура (АТП), аутоиммунные заболевания щитовидной железы, аутоиммунная крапивница, аутоиммунно-опосредованные заболевания желудочно-кишечного тракта, аксональные и нейрональные невропатии, болезнь Бало, болезнь Бехчета, семейное доброкачественное, ишемически-реперфузионное повреждение, доброкачественный лимфоцитарный васкулит, болезнь Бергера (IgA нефропатия), экзогенный аллергический альвеолит, слепота, болезнь Бека, облитерирующий бронхиолит (без пересадки) при NSIP (неспецифическая интерстициальная пневмония), бронхит, бронхопневматический аспергиллез, синдром Брутона, буллезный пемфигоид, синдром Каплана, кардиомиопатия, сердечно-сосудистая ишемия, синдром Кастельмана, глютеновая болезнь, целиакия, спру целиакия (глютеновая энтеропатия), дегенерация мозжечка, церебральная ишемия, заболевания, сопровождающиеся васкуляризацией, болезнь Шагаса, каналопатии (например, эпилепсия), каналопатии ЦНС, хориоретинит, хориоидит, аутоиммунные гематологические расстройства, хронический активный гепатит и аутоиммунный хронический активный гепатит, хронический контактный дерматит, хроническая эозинофильная пневмония, синдром хронической усталости, хронический гепатит, хронический аллергический пневмонит, хронический воспалительный артрит, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), хроническое стойкое воспаление, хронический кожно-слизистый кандидоз, хронические невропатии (например, IgM-полиневропатия или IgM-опосредованная невропатия), хроническая обструктивная болезнь легких, хроническое воспаление легких, хронический рецидивирующий мультифокальный остомиелит (CRMO), хронический тиреоидит (тиреоидит Хашимото) или подострый тиреоидит, синдром Черджа-Стросса, рубцовый пемфигоид/доброкачественный пемфигоид слизистой оболочки, воспалительные заболевания центральной нервной системы, васкулит ЦНС, целиакия, синдром Когана, синдром холодовой агглютинации, полипозный колит, колиты, такие как язвенный колит, коллагеновый колит, сопровождающийся инфильтрацией Т-клеток и хронические воспалительные реакции, врожденный порок сердца, врожденная краснуха, анемия с положительной пробой Кумбса, заболевания коронарных артерий, миокардит Коксаки, CREST синдром (кальциноз, синдром Рейно), болезнь Крона, криоглобулинемия, синдром Кушинга, циклит (например, хронический циклит, гетерохронный циклит, иридоциклит или циклит Фукса), муковисцидоз, цитокин-индуцированная токсичность, глухота, дегенеративный артрит, демиелинизирующие заболевания (например, аутоиммунные демиелинизирующие заболевания), демиелинизирующие невропатии, лихорадка денге, герпетиформный дерматит и атопический дерматит, в том числе контактный дерматит, дерматомиозит, дерматозы с острым воспалением, болезнь Девика (нейромиелит зрительного нерва), расстройства крупных артерий, вызванные диабетом, диабетическая нефропатия, диабетическая ретинопатия, синдром Даймонда-Блэкфена, диффузный интерстициальный легочный фиброз, дилатационная кардиомиопатия, дискоидная красная волчанка, заболевания, сопровождаемые диапедезом лейкоцитов, синдром Дресслера, контрактуры Дюпюитрена, инфекции эхо-

вирусом, экзема, в том числе сопровождаемая аллергическим или атопическим дерматитом, энцефалит, такой как энцефалит Расмуссена и энцефалит лимбической системы и/или ствола мозга, энцефаломиелит (например, аллергический энцефаломиелит или экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ)), внутриартериальная гиперплазия, эндокардит, эндокринная офтальмопатия, эндометриоз, эндомиокардиальный фиброз, факоанафилактический эндофтальмит, эндофтальмит, энтерит, аллергический синдром эозинофилии-миалгии, эозинофильный фасциит, эпидемический кератоконъюнктивит, приобретенный буллезный эпидермолиз (ПБЭ), эписклера, эписклеритом, вирусная инфекция Эпштейна-Барра, стойкая возвышающаяся эритема, мультиформная эритема, узловатая лепрозная эритема, узловатая эритема, эритробластоз пищевода зародыша, нарушения эзофагеальной моторики, криоглобулинемия смешанного типа, этмоидит, синдром Эванса, экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ), дефицит фактора VIII, "легкое фермера" или экзогенный аллергический альвелиолит, ревматическая лихорадка, синдром Фелти, фибромиалгия, фиброзирующий альвеолит, флариаз, фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), пищевые отравления, атрофия желудка, гигантоклеточный артериит (темпоральный артериит), гигантоклеточный гепатит, гигантоклеточная полимиалгия, гломерулонефритиды, гломерулонефрит (ГН) с и без нефротического синдрома, такой как хронический или острый гломерулонефрит (например, первичный ГН), синдром Гудпасчера, подагрический артрит, синдромы, связанные с переливанием гранулоцитов, гранулематоз, включая лимфоматоидный гранулематоз, гранулематоз с полиангиитом (GPA), гранулематозный увеит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, каплевидный псориаз, пароксизмальная гемоглобинурия, болезнь Хаммена-Рича, болезнь Хашимото, энцефалит Хашимото, тиреоидит Хашимото, гемохроматоз, гемолитическая анемия или иммунная гемолитическая анемия, в том числе аутоиммунная гемолитическая анемии (AIHA), гемолитическая анемия, гемофилия, пурпура Шенлейна-Геноха, герпес беременных, вирус иммунодефицита индивидуума (ВИЧ), гипералгезии, гипогаммаглобулинемия, гипогонадизм, гипопаратиреоз, идиопатический несахарный диабет, идиопатический паралич лицевого нерва, идиопатический гипотиреоз, идиопатическая IgA нефропатия, идиопатический мембранный ГН или идиопатическая мембранная нефропатия, идиопатический нефротический синдром, идиопатический легочный фиброз, идиопатическая спру, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP) IgA нефропатия, IgE-опосредованные заболевания (например, анафилаксии, аллергический и атопический ринит), IgG4-связанные склеротические заболевания, регионарный илеит, иммунокомплексный нефрит, иммунные ответы, связанные с острой и отсроченной гиперчувствительностью, опосредованные цитокинами и Т-лимфоцитами, иммунный ГН, иммунорегуляторные липопротеины, в том числе острый респираторный дистресс-синдром или респираторный дистресс-синдром взрослых (ARDS), миозит с тельцами включения, инфекционный артрит, бесплодие из-за анти-сперматозоидных антител, воспаление всего или части увеального тракта, воспалительные заболевания кишечника (IBD), воспалительные гиперпролиферативные заболевания кожи, воспалительная миопатия, инсулинзависимый сахарный диабет (I типа), инсулит, интерстициальный цистит, интерстициальное заболевание легких, интерстициальный фиброз легких, ирит, ишемическое реперфузионное повреждение, воспаление суставов, ювенильный артрит, юношеский дерматомиозит, ювенильный диабет, юношеский сахарный диабет (I типа), включая инсулин-зависимый сахарный диабет у детей (IDDM), ювенильный ревматоидный артрит, синдром Кавасаки, сухой кератоконъюнктивит, трипаносомоз, синдром Ламберта-Итона, лейшманиоз, проказа, лейкопения, недостаточность адгезии лейкоцитов, лейкоцитокластический васкулит, лейкопения, красный плоский лишай, склероатрофический лишай, кератоконъюнктивит, линейный IgA дерматоз, линейные IgA заболевания (LAD), синдром Леффлера, волчаночный гепатит, волчанка (в том числе нефрит, энцефалит, педиатрическая, непочечная, внепочечная, дискоидная, алопеция), волчанка (СКВ), диссеминированная красная волчанка, артрит Лайма, болезнь Лайма, лимфоидная интерстициальная пневмония, малярия, мужское и женское аутоиммунное бесплодие, верхнечелюстной (васкулит?? а хрен знает), васкулит средних сосудов (в том числе болезнь Кавасаки и узелковый полиартрит), мембранный или мембранный пролиферативный ГН (MPGN), в том числе I типа и II типа, быстро прогрессирующий ГН, мембранный ГН (мембранные нефропатии), болезнь Меньера, менингит, микроскопический колит, микроскопический полиангиит, мигрень, нефропатия с минимальными изменениями, смешанные заболевания соединительной ткани (MCTD), инфекционный мононуклеоз, язва Морена, болезнь Муха-Габермана, мультифокальная моторная нейропатия, эндокринная множественная недостаточность, синдром множественного повреждения органов вследствие сепсиса, травмы или кровотечения, синдром множественного повреждения органов, рассеянный склероз (РС), такой, как спинно-оптический РС, эпидемический паротит, мышечные нарушения, миастения гравис, например, ассоциированная с тимомой миастения гравис, миокардит, миозит, нарколепсия, некротизирующий энтероколит и трансмуральный колит, аутоиммунные воспалительные заболевания кишечника, некротизирующий, кожный или аллергический васкулит, неонатальный волчаночный синдром (НВС), нефроз, нефротический синдром, неврологические заболевания, нейромиелит зрительного нерва (Девика), нейромиелит зрительного нерва, нейромиотония, нейтропения, доброкачественный лимфоцитоз, негранулематозный увеит, доброкачественные тимомы, глазные и орбитальные воспалительные заболевания, глазной рубцовый пемфигоид, оофорит, симпатическая офтальмия, опсоклонус миоклонус синдром (OMS) опсоклонус или опсоклонус миоклонус синдром (OMS), и сенсорная невропатия, неврит зрительного нерва, гранулематозный орхит, остео-

артроз, палиндромный ревматизм, панкреатит, панцитопения, PANDAS (детское аутоиммунное психоневрологическое расстройство, ассоциированное со стрептококком), паранеопластическая дегенерация мозжечка, паранеопластический синдром, паранеопластические синдромы, в том числе неврологические паранеопластические синдромы (например, миастенический синдром Ламберта-Итона или синдром Ламберта-Итона), паразитарные заболевания, такие как лейшманиоз, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), синдром Парри-Ромберга, парспланит (периферический увеит), синдрома Персоннейджа-Тернера, парвовирусные инфекции, пемфигоид, такой как буллезный и кожный пемфигоид, пузырчатка (в том числе обыкновенная пузырчатка), волчанковая пузырчатка, листовидная пузырчатка, пемфигоид слизистых, пузырчатка, язвенная болезнь, периодический паралич, периферическая невропатия, перивенозной энцефаломиелит, злокачественная анемия (пернициозная анемия), злокачественная анемия, факоантигенный увеит, цирроз легкого, синдром Кроу-Фуказа (POEMS), узелковый полиартрит, первичный хронический полиартрит I, II и III типа, полихондрит (например, устойчивый или рецидивирующий полихондрит), полиэндокринное аутоиммунное заболевание, полиэндокринная недостаточность, полигландулярный синдром (например, аутоиммунный полигландулярный синдром (или полигландулярный эндокринопатический синдром)), ревматическая полимиалгия, полимиозит, полимиозит/дерматомиозит, полинейропатия, острый полирадикулоневрит, посткардиотомный синдром, задний увеит или аутоиммунный увеит, постинфарктный синдром, посткардиотомный синдром, постстрептококковый нефрит, поствакцинальный синдром, пресенильное слабоумие, первичный билиарный цирроз, первичный гипотиреоз, первичная идиопатическая микседема, первичный лимфоцитоз, включающий моноклональный В-клеточный лимфоцитоз (например, доброкачественную моноклональную гаммапатию и моноклональную гаммапатию неопределенного значения, MGUS), первичная микседема, первичный прогрессирующий РС (PPMS) и возвратно-ремиттирующий РС (RRMS), первичный склерозирующий холангит, прогестероновый дерматит, прогрессирующий системный склероз, пролиферативный артрит, псориаз, такой как пятнистый псориаз, псориаз, псориатический артрит, легочно-альвеолярный протеиноз, эозинофильный инфильтрат легкого, истинная эритроцитарная анемия или аплазия (PRCA), гнойный или безгнойный синусит, пустулезный псориаз и псориаз ногтей, пиелит, гангренозная пиодермия, тиреоидит Кервена, феномен Рейно, реактивный артрит, привычный выкидыш, снижение артериального давления, рефлекторная симпатическая дистрофия, устойчивое спру, болезнь или синдром Рейтера, рецидивирующий полихондрит, реперфузионное повреждение миокарда или других тканей, реперфузия травмы, респираторный дистресс-синдром, синдром беспокойных ног, аутоиммунные заболевания сетчатки, забрюшинный фиброз, синдром Рейно, ревматические заболевания, ревматизм, ревматическая лихорадка, ревматоидный артрит, ревматоидный спондилит, инфекция вирусом краснухи, синдром Сэмптера, саркоидоз, шистосомоз, синдром Шмидта, SCID и связанные с вирусом Эпштейн-Барр заболевания, заболевания склеры, склерит, склеродактилия, склеродермия (включая системную склеродермию), склерозирующий холангит, диссеминированный склероз, склероз, такой как системный склероз, сенсоневральная потеря слуха, серонегативные спондилоартриты, синдром Шихана, синдром Шульмана, силикоз, синдром Шегрена, аутоиммунность к сперме и яичкам, клиновидной синусит, синдром Стивенса-Джонсона, синдром мышечной скованности, подострый бактериальный эндокардит (SBE), подострая кожная красная волчанка, внезапная потеря слуха, синдром Сусака, хорея Сиденхема, симпатическая офтальмия, системная красная волчанка (СКВ) или системная эритематозная волчанка (например, кожная СЭВ), системный некротический васкулит и ANCA-ассоциированный васкулит, такой как васкулит или синдром Черджа-Стросса (CSS), сухотка спинного мозга, артериит Такаясу, телеангиэктазия, височный артериит/гигантоклеточный артериит, облитерирующий тромбангиит, тромбоцитопения (например, развивающаяся у больных инфарктом миокарда), в том числе тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP) и аутоиммунная или иммунная тромбоцитопения, такая как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP), включая хроническую или острую ITP, тромбоцитопеническая пурпура (TP), тиреотоксикоз, повреждение тканей, синдром Толоса - Ханта, токсический эпидермальный некролиз, синдром токсического шока, реакции на переливание, транзиторная гипогаммаглобулинемия новорождённых, поперечный миелит, поперечный миелит, тропическая легочная эозинофилия, туберкулез, язвенный колит, недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), крапивница (например, хроническая аллергическая крапивница и хроническая идиопатическая крапивница, в том числе хроническая аутоиммунная крапивница), увеит (например, передний увеит), увеоретинит, вальвулит, сосудистая дисфункция, васкулит, позвоночный артрит, везикуло-буллезный дерматоз, витилиго, гранулематоз Вегенера (в настоящее время известен как гранулематоз с полиангиитом (GPA), синдром Вискотта-Олдрича, и сцепленный с Х-хромосомой гипер IgM синдром.

KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела, описанные здесь, могут быть использованы в композициях, применениях и способах лечения воспалительных состояний и воспалительных заболеваний.

Воспалительные состояния и воспалительные заболевания включают ревматические заболевания (например, ревматоидный артрит, остеоартрит, псориатический артрит), спондилоартропатии (например, анкилозирующий спондилит, реактивный артрит, синдром Рейтера), кристаллические артропатии (например, подагру, псевдоподагру, болезнь отложения пирофосфата кальция), рассеянный склероз, болезнь Лайма, ревматическую полимиалгию; заболевания соединительной ткани (например, системную крас-

ную волчанку, системный склероз, полимиозит, дерматомиозит, синдром Шегрена); васкулиты (например, узелковый полиартериит, гранулематоз Вегенера, синдром Черга-Стросса); воспалительные состояния, включая последствия травмы или ишемии, саркоидоз; сосудистые заболевания, включая атеросклеротические сосудистые заболевания, атеросклероз и сосудистые окклюзионные болезни (например, атеросклероз, ишемическую болезнь сердца, инфаркт миокарда, инсульт, заболевания периферических сосудов) и рестеноз стента сосуда; глазные заболевания, включая увеит, болезнь роговицы, ирит, иридоциклит и катаракты, но не ограничиваются ими.

Воспалительные заболевания также включают такие заболевания как рефлюкс/изжоги, акне, вульгарные угри, аллергии и чувствительности, болезни Альцгеймера, астму, атеросклероз и сосудистый облитерирующий эндартериит (например, атеросклероз, ишемическую болезнь сердца, инфаркт миокарда, инсульт, заболевания периферических сосудов) и рестеноз стента сосуда, аутоиммунные заболевания, бронхит, рак, кардит, катаракта, целиакия, хронические боли, хронический простатит, цирроз, колит, болезни соединительной ткани (например, системную красную волчанку, системную склеродермию, полимиозит, дерматомиозит, синдром Шегрена), заболевания роговицы, болезнь Крона, кристаллические артропатии (например, подагра, псевдоподагра, болезнь отложения пирофосфата кальция), деменцию, дерматит, диабет, сухость глаз, экзему, отек, эмфизему, фибромиалгии, гастроэнтерит, гингивит, гломерулонефрит, болезни сердца, гепатит, высокое кровяное давление, гиперчувствительность, воспалительные заболевания кишечника, воспалительные состояния, включая последствия травм или ишемии, инсулинорезистентность, интерстициальный цистит, иридоциклит, ирит, боли в суставах/артрит/ревматоидный артрит, болезнь Лайма, метаболический синдром (синдром X), рассеянный склероз, миозит, нефрит, ожирение, заболевания глаз, в том числе увеит, остеопению, остеопороз, болезнь Паркинсона, воспалительные заболевания таза, пародонтоз, полиартрит, полихондрит, ревматическую полимиалгию, псориаз, реперфузионное повреждение, ревматический артрит, ревматические заболевания (например, ревматоидный артрит, остеоартрит, псориатический артрит), ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермия, синусит, синдром Шегрена, спастическая толстая кишка (синдром раздраженного кишечника), спондилоартропатии (например, Бехтерева, реактивный артрит, синдром Рейтера), системный кандидоз, тендинит, реакция отторжения трансплантата, инфекции мочевых путей, вагинит, сосудистую болезнь, включая атеросклеротические сосудистые заболевания, васкулиты (например, узелковый полиартрит, гранулематоз Вегенера, синдром Черга-Стросса) и васкулит, но не ограничиваются ими.

Понятие "лечение" в данном случае относится к доставке эффективного количества такой композиции с целью предотвращения каких-либо симптомов или развития болезненного состояния или с целью предотвращения (например, предупреждения или замедления прогрессирования), ослабления, облегчения или ликвидации (излечения) таких симптомов или уже развившихся болезненных состояний. Понятие "лечение", таким образом, означает и лечение минимальных или необнаруживаемых заболеваний, например, у человека, имеющего ответ на лечение после первого лечения или лечения развившейся и/или острой фазы заболевания.

Доставка анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела субъекту (путем непосредственного введения или путём экспрессии нуклеиновой кислоты, как, например, с помощью переносящего ген вектора вируса оспы, содержащего нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела) и другие способы в соответствии с данным изобретением могут быть использованы с целью предотвращения (например, предотвращения или замедления прогрессирования), ослабления, облегчения или ликвидации (излечения) таких симптомов или уже развившихся болезненных состояний.

Способы данного изобретения могут быть особенно полезны для уменьшения и/или снижения активности, пролиферации или числа Т-клеток (например, количества активированных провоспалительных Т-клеток (например, $CD4^+$ Т-клеток, HLA-cw3 и/или HLA-cw4-положительных Т-клеток), циркулирующих или находящихся в месте воспаления) и любого параметра или симптома, связанного с ним (например, уровней маркеров воспаления). Способы, которые уменьшают, предотвращают или иным образом облегчают такие аспекты воспалительных или аутоиммунных расстройств, независимо и совместно, являются преимуществами данного изобретения. Используемое здесь понятие "Т-клетки" относится к субпопуляции лимфоцитов, которые созревают в тимусе и имеют на своей поверхности, помимо других молекул, Т-клеточные рецепторы. Т-клетки могут быть идентифицированы на основании определенных характеристик и биологических свойств, таких как экспрессия специфических поверхностных антигенов, в том числе TCR, CD4 или CD8, способность определённых Т-клеток убивать опухолевые или инфицированные клетки, способность определённых Т-клеток активировать другие клетки иммунной системы, а также способность высвобождать молекулы белков, называемых цитокинами, которые стимулируют или подавляют иммунный ответ. Любая из этих характеристик и активностей может быть использована для идентификации Т-клеток с использованием способов, хорошо известных в данной области. В контексте данного изобретения "активные" или "активированные" Т-клетки означают биологически активные Т-клетки, более конкретно, Т-клетки, имеющие способность к цитолизу или стимуляции иммунного ответа, например, путем секреции цитокинов. Активные клетки могут быть обнаружены любым из нескольких хорошо известных способов, в том числе и функциональными анализами и анализами на основе экспрессии цитокинов, таких как ФНО-альфа.

Способы лечения пациента, имеющего аутоиммунное или воспалительное заболевание, могут включать в себя введение пациенту анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела. В одном варианте осуществления человек имеет развившееся аутоиммунное или воспалительное заболевание (например, оно установлено в течение продолжительного периода времени, например, более одного года), имеет признаки текущего или активного воспаления, имеет физические признаки заболевания (например, опухание суставов, поражения, неврологические симптомы), имеет хроническое заболевание, имеет тяжелое заболевание (что определено действующими критериями, например DAS или ACR критериями при ревматоидном артрите), или имеет прогрессирующую болезнь.

Способы лечения пациента, имеющего развившееся аутоиммунное или воспалительное заболевание, могут включать введение пациенту анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител. Настоящее изобретение относится к способам лечения острых фаз или приступа, кризиса, обострения или вспышки аутоиммунных или воспалительных заболеваний с использованием анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител (или связанных с ними композиций), и предпочтительно, антитело вводят пациенту во время острой фазы или во время приступа, кризиса, обострения или вспышки аутоиммунного или воспалительного заболевания. Заболевание может быть выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, ювенильного идиопатического артрита, рассеянного склероза, болезни Крона или ректоколита, красной волчанки, анкилозирующего спондилита и родственных заболеваний. В одном воплощении заболевание характеризуется наличием клеток, экспрессирующих анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 лиганд (например, HLA-cw3 или HLA-cw4), предпочтительно присутствием $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих HLA-cw3 и/или HLA-cw4. Болезнь характеризуется наличием заметных уровней протеолитического фермента, воспалительного медиатора, маркера постоянного воспаления или провоспалительного цитокина (например, ФНО-α и/или интерлейкина-1 (IL-1)).

Диагностирование заболевания, его развития и его оценка (или стадийность) могут быть определены с помощью стандартных медицинских критериев для конкретного типа заболевания для того, чтобы определить, есть ли у человека развившаяся болезнь, находится ли она в острой фазе, прогрессирует, является хронической, имеет физические симптомы или находится на определенном уровне тяжести. Кроме того, приступ, кризис, обострение или вспышки могут быть идентифицированы с помощью любых подходящих медицинских критериев.

Анти-KTR2DL1, 2 и/или 3 антитела могут быть с успехом использованы для лечения развившегося заболевания. "Развившееся заболевание" относится к аутоиммунным или воспалительным заболеваниям, которое проявлялось в течение длительного периода времени, например более одного года. В зависимости от конкретного заболевания установленное заболевание также означает заболевание, которое не контролируется, например, которое до сих пор прогрессирует или при котором пациент не испытывает ремиссии в присутствии или в отсутствие лечения. В одном аспекте изобретение обеспечивает способ лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания у пациента, включающий (а) определение у указанного пациента развившейся болезни и, (б) если указанный пациент имеет развившееся заболевание, введение указанному пациенту эффективной дозы анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела.

Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3-антитела могут также успешно использоваться для лечения хронических заболеваний. Понятие "хроническое заболевание" относится к болезни, которая сохраняется в течение длительного периода времени. Например, хроническим заболеванием может быть болезнь, длящаяся 3 месяца и более, как это определено Национальным центром США по статистике здравоохранения. Один из аспектов данного изобретения обеспечивает способ для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания у пациента, включающий (а) определение у указанного пациента хронической болезни и, (б) если указанный пациент имеет хроническое заболевание, введение указанному пациенту эффективной дозы анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела.

Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела могут также успешно использоваться для лечения лиц, имеющих приступы, кризисы, обострения или вспышки. Понятия "приступ", "кризис", "обострение" и "вспышка" означают более быстрое развитие новых симптомов или усиление старых симптомов, связанных с воспалительным или аутоиммунным заболеванием. Такие фазы длятся в течение определенного периода времени, несколько часов или дней, в отличие от медленного прогрессирования заболевания, которое происходит в течение месяцев и лет. Во время таких приступов пациент испытывает лихорадку, боль, воспалительный синдром (схожий с гриппом синдром). При РА суставы пациента становятся опухшими и болезненными. Пациент может испытывать гриппоподобные синдромы. Кризис может длиться от нескольких часов до нескольких недель. При рассеянном склерозе вспышки может отличать новый симптом или усиление существующего симптома, которые должны продолжаться не менее 24 ч, чтобы считаться истинным обострением, вспышка означает новые поражения, формирующиеся в головном или спинном мозге, что приводит к нарушению нервной передачи. Большинство вспышек длятся несколько дней или недель, но могут длиться в течение нескольких месяцев. Эффекты могут быть, например, следующими: трудности при движении или спазмы, проблемы с равновесием и координацией; проблемы со зрением, несогласованные движения глаз, помутнение зрения или двоение в глазах, частичная слепота во время вспышки; симптомы, касающиеся мочевого пузыря и кишечника; проблемы половой сферы, изменения в психической функции: потеря памяти, невнимательность и ухудшение мысли-

тельной деятельности или депрессия. При болезни Крона или ректоколите вспышки в основном представляют собой обострение симптомов заболевания Крона: диарея, судорожные боли в животе, лихорадка, потеря аппетита. Один аспект данного изобретения обеспечивает способ лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания у пациента приступа, кризиса, обострения или вспышки, включающий (а) определение у указанного пациента и, (б) если указанный пациент имеет приступ, кризис, обострение или вспышку, введение указанному пациенту эффективной дозы анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела.

Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела можно также успешно использовать для лечения лиц, имеющих рецидив. Понятие "рецидив" относится к периоду усиления или стабилизации симптомов пациента. Заболевание является рецидивирующим в том случае, когда здоровье или состояние больного ухудшается. Один аспект данного изобретения обеспечивает способ лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания у пациента, включающий (а) определение у указанного пациента рецидива и, (б) если указанный пациент имеет рецидив, введение указанному пациенту эффективной дозы анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела.

При необходимости может быть осуществлен этап обнаружения HLA-cw3 и/или HLA-cw4 до применения анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела, включающий обнаружение присутствия HLA-cw3 и/или HLA-cw4 у пациента. Как правило, на этом этапе у пациента берут биологический образец, например образец синовиальной жидкости, например, у пациента, имеющего ревматоидный артрит. Биологический образец оценивают на наличие HLA-cw3 и/или HLA-cw4 полипептида или нуклеиновой кислоты. Если биологический образец является положительным на наличие HLA-cw3 и/или HLA-cw4, пациент может затем предпочтительно быть подвергнут лечению анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителами.

Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела используют в монотерапии (один терапевтический агент). Способы лечения с применением данного изобретения могут дополнительно включать обработку индивидуума анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителами и вторым терапевтическим агентом, в том числе агентами, обычно используемыми для конкретной терапевтической цели, для которой вводят антитело. Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела и второй терапевтический агент могут быть введены отдельно, вместе или последовательно, или в смеси. Второй терапевтический агент обычно вводят в количествах, используемых обычно для этого агента при монотерапии конкретного заболевания или состояния, подлежащего лечению. В одном воплощении второй терапевтический агент вводят в дозе менее общепринятой эффективной дозы; например, в различных вариантах воплощения композиция содержит дозу, которая составляет 10-75% от общепринятой эффективной вводимой дозы. Предпочтительно, чтобы второй терапевтический агент являлся агентом, который снижает активность протеолитических ферментов, воспалительного медиатора или провоспалительного цитокина, такого как ФНО-α и/или интерлейкин-1 (IL-1). Предпочтительно, чтобы второй терапевтический агент относился к DMARD или DMD, необязательно, кроме того, второй агент является метотрексатом (Rheumatrex®, Trexall®), гидроксихлорохином (Plaquenil®), сульфасалазином (Azulfidine®), лефлуномидом (Arava®), ингибитором фактора некроза опухоли (например, растворимым рецептором ФНОα, таким как этанерцепт (Enbrel®), нейтрализующими (предпочтительно неисчерпывающимися) анти-ФНОα антителами, такими как адалимумаб (Humira®) или цетролизумаб пегол (Cimzia®)), агентом, блокирующим костимуляцию Т-клеток (например, абатацепт (Orencia®)), антагонистом рецептора интерлейкина-1 (IL-1) (анакинра (Кинерет®)), анти-BlyS антителом (Benlysta®), ингибитором протеосом (например, бортезомиб) ингибитором тирозинкиназы, внутримышечным золотом или другим иммуномодулирующим или цитотоксическим агентом (например, азатиоприн (Imuran®), циклофосфамид, циклоспорин А (Neoral®, Sandimmune®)) или ингибитором киназы (например, ингибитор киназы SYK, такой как фостиматиниб (R788) или ингибиторы JAK1, JAK2, такие как INCB28050, танезумаб или тасоситиниб (CP-690,550)).

Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело вводят до введения второго терапевтического агента. Например, анти- KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела могут быть введены примерно за 0-30 дней до введения второго терапевтического агента. В некоторых вариантах воплощения анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело вводят за от около 30 мин до около 2 недель, от около 30 мин до около 1 недели, от около 1 до около 2 ч, от около 2 до около 4 ч, от около 4 до около 6 ч, от около 6 до около 8 ч, от около 8 ч до 1 дня или от около 1 до 5 дней до введения второго терапевтического агента. В некоторых вариантах воплощения анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело вводят одновременно с введением терапевтических агентов. Анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело вводят после введения второго терапевтического агента. Например, анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела можно вводить около от 0 до 30 дней после введения второго терапевтического агента. В некоторых вариантах воплощения анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитело вводят от около 30 мин до около 2 недель, от около 30 мин до около 1 недели, от около 1 до около 2 ч, от около 2 до около 4 ч, от около 4 до около 6 ч, от около 6 до около 8 ч, от около 8 ч до 1 дня или от около 1 до 5 дней после введения второго терапевтического агента.

Композиция может дополнительно содержать по меньшей мере один противовоспалительный агент, анальгезирующее средство или модифицирующий заболевание противоревматический препарат (DMARD).

Противовоспалительный агент может быть выбран из группы, состоящей из стероидов, кортизона,

глюкокортикоидов, преднизона, преднизолона, гидрокортизона (кортизола), кортизонацетата, метилпреднизолона, дексаметазона, бетаметазона, триамцинолона, беклометазона и флудрокортизонацетата, нестероидных противовоспалительных препаратов (NSAID), ибупрофена, напроксена, мелоксикама, этодолака, набуметона, сулиндака, толементина, холинсалицилата магния, диклофенака, дифлузинала, индометацина, кетопрофена, оксапрозина, пироксикама и нимесулида, салицилатов, аспирина (ацетилсалициловой кислоты), дифлунизала, салсалата, п-аминопроизводных фенола, парацетамола, фенацетина, производных пропионовой кислоты, ибупрофена, напроксена, фенопрофена, кетопрофена, флурбипрофена, оксапрозина, локсопрофена, производных уксусной кислоты, индометацина, сулиндака, этодолака, кеторолака, диклофенака, набуметона, производных еноловой кислоты (оксикама), пироксикама, мелоксикама, теноксикама, дроксикама, ломоксикама, изоксикама, производных фенамовой кислоты (фенаматов), мефенамовой кислоты, меклофенамовой кислоты, флуфенамовой кислоты, толфенамовой кислоты, селективных ингибиторов COX-2 (коксибов), целекоксиба, рофекоксиба, вальдекоксиба, парекоксиба, лумиракоксиба, эторикоксиба, фирококсиба, сульфонанилидов, нимесулида и ликофелона.

Ревматоидный артрит.

Ревматоидный артрит (РА) является хроническим и обычно прогрессирующим воспалительным заболеванием, при котором основным местом воспаления являются синовиальные оболочки. Разрушение костной ткани происходит с прогрессированием воспаления, что приводит к деформации или повреждению костей и хрящей. Ревматоидный артрит (РА) прогрессирует в несколько этапов. Первый этап представляет собой отек синовиальной выстилки, вызывающий боль, повышение температуры, жесткость, покраснение и отек вокруг сустава. Второй этап - это быстрое деление и рост клеток, или паннус, что вызывает уплотнение синовиальной оболочки. На третьем этапе воспаленные клетки выделяют ферменты, которые могут разрушать кости и хрящи, что часто является причиной потери формы и расстройства нормального расположения такого сустава, вызывает сильные боли и приводит к потере двигательной функции. Пациент с таким заболеванием может испытывать период ремиссии, без боли, а затем кризис ревматоидного артрита, также называемый вспышкой или приступом, когда боль усиливается. Предлагается с помощью способов данного изобретения лечить такого пациента, переживающего кризис, чтобы помочь ему справиться с болью.

Уровень заболевания РА может быть оценен с использованием различных критериев. Наиболее известные критерии были созданы ACR (Американский колледж ревматологии). Критерии ACR обозначены как ACR 20, ACR 50 и ACR 70. Критерии ACR определяют усиление болезненности или опухания суставов и прогрессирование по следующим пяти пунктам: реакции острой фазы (например, скорость оседания эритроцитов), оценка своего состояния пациентом, оценка состояния врачом, шкала боли и анкета нетрудоспособности/функциональности.

Тяжесть заболевания также может быть измерена по шкале, известной как DAS (шкала активности заболевания). DAS является составным индексом активности РА, составленным EULAR (Европейская лига борьбы с ревматизмом), первоначально разработанным для 44 суставов с синовитом и 53 сайтов индекса Ричи. DAS рассчитывают по следующей формуле:

$$DAS = [0{,}553938\ \sqrt{\text{индекс Ричи}}] + [0{,}06465\ \sqrt{(\text{количество суставов с синовитом})}] + [0{,}330\ \ln(\text{скорость оседания эритроцитов})] + 0{,}024.$$

Индекс Ричи охватывает 53 сустава: височно-челюстные, акромиально-ключичные, грудинно-реберно-ключичные, плечевые, локтевые, запястные, пястно-фаланговые (MCP), проксимальные межфаланговые в пальцах (PIP), тазобедренные, коленные, голеностопные, подтаранные, поперечные плюсневые и плюсно-фаланговые (MTP).

Три уровня активности были определены в соответствии со значением DAS: РА с низким уровнем активности, DAS<2,4, умеренно активный РА, 2,4<DAS<3,7, активный РА>3,7. Пороговое значение ремиссии составляет DAS<1,6.

Основной целью способов лечения согласно данному изобретению является контроль за активностью заболевания и, кроме того, достижение ремиссии, уменьшение болей, предотвращение и контролирование разрушения суставов, предотвращение потери функции в повседневной и трудовой деятельности, а также оптимизирование качества жизни пациента.

Текущие способы лечения.

Текущие рекомендации для лечения РА включают раннее лечение противоворевматическими препаратами (DMARD) после установления диагноза. Нестероидные противовоспалительные препараты (NSAID) и, до недавнего времени, ингибиторы ЦОГ-2 широко применяли до подтверждения диагноза или после, при течении заболевания, в сочетании с DMARD. Метотрексат является наиболее широко используемым DMARD, но также предписаны и другие агенты, в том числе гидроксихлорохин, сульфасалазин, золото, миноциклин и лефлуномид. Кортикостероиды могут быть использованы в сочетании с DMARD, но в целом для минимизации побочных эффектов используют только низкие дозы (O'Dell, New Engl. J. Med. 350:2591-2603, 2004). В последние годы уделяют внимание противоцитокиновой терапии, направленной на воспалительные цитокины, в результате чего были разработаны новые биофармацевтические препараты, имеющие эффективное анти-ревматическое действие, такие как инфликсимаб, этанерцепт, анакинра и атлизумаб. Тем не менее, в настоящее время нет полностью эффективного лечения, и

сохраняется потребность в эффективном лечении заболевания, улучшении комфорта пациента, облегчении боли и альтернативных способах лечения, необходимых для улучшения обычной жизни пациента. Некоторые из основных способов лечения рассмотрены в настоящем документе.

Нестероидные противовоспалительные средства (NSAID). Эти препараты подавляют выработку простагландинов путем блокирования циклооксигеназных ферментов ЦОГ-1 и ЦОГ-2. Простагландины являются медиаторами воспаления и боли, но, кроме того, играют важную роль в поддержании нормальных функций организма, включая защиту от желудочной кислоты, поддержание кровотока почек, способность тромбоцитов к слипанию и сосудистую функцию. Селективные ингибиторы ЦОГ-2 выборочно блокируют продукцию простагландинов, производимых ЦОГ-2, которые играют заметную роль в воспалении. Доступно много различных NSAID, некоторые отпускаются без рецепта, включая аспирин, ибупрофен (Advil®, Motrin®, Nuprin®) и напроксен (Alleve®), а многие другие доступны по рецепту врача, включая мелоксикам (Mobic®), этодолак (Lodine®), набуметон (Relafen®), сулиндак (Clinoril®), толементин (Tolectin®), холинсалицилат магния (Trilasate®), диклофенак (Cataflam®, Вольтарен®, Arthrotec®), дифлусинал (Dolobid®), индометацин (Indocin®), кетопрофен (Orudis®, Oruvail®), оксапозин (Daypro®) и пироксикам (Feldene®). NSAID более длительного действия, которое позволяют принимать препарат ежедневно или два раза в день, могут улучшить восприятие лечения пациентом. Класс NSAID также включает препараты, известные как ингибиторы ЦОГ-2, которые также эффективны в борьбе с воспалением (целекоксиб, Celebrex®; эторикоксиб, Arcoxia®; лумиракоксиб, Prexige®).

Кортикостероиды (преднизон; метилпренизолон, Medrol®) имеют противовоспалительное и иммунорегуляторное действие. Их можно принимать перорально, внутривенно, внутримышечно или они могут быть введены непосредственно в сустав. Кортикостероиды полезны в начале заболевания как временная дополнительная терапия перед применением DMARD, оказывающая противовоспалительное действие. Кортикостероиды также полезны в качестве хронической дополнительной терапии у больных с тяжелым течением болезни, которая не очень хорошо контролируется NSAID и DMARD. Обычная доза преднизона составляет от 5 до 10 мг ежедневно. Хотя преднизон может быть введён при более высоких дозах (15-20 мг в день), должны быть предприняты попытки снизить дозу в течение нескольких недель до менее 10 мг ежедневно. После начала лечения кортикостероидами бывает очень трудно прекратить его и даже при низких дозах. Некоторые пациенты очень чувствительны к снижению дозы преднизона, которая обычно понижается медленно, в течение нескольких недель.

Модифицирующие заболевание противоревматические препараты (DMARD): хотя и NSAID, и DMARD-агенты облегчают симптомы активного ревматоидного артрита, только DMARD-агенты, как было показано, способны изменить течение заболевания и улучшить результаты рентгенографических анализов. DMARD влияют на ревматоидный артрит иначе, чем NSAID и кортикостероиды, изменяя его течение и начало прогрессирования. В большинстве случаев, когда диагноз ревматоидного артрита подтвержден, необходимо применять DMARD агенты. Наличие эрозий или сужения суставной щели на рентгеновских снимках повреждённых суставов является четким показанием для DMARD терапии, однако нет необходимости ждать таких изменений на рентгеновских снимках. К имеющимся в настоящее время лекарственным препаратам относятся метотрексат (Rheumatrex®, Trexall®), гидроксихлорохин (Plaquenil®), сульфасалазин (Azulfidine®), лефлуномид (Arava®), ингибирор фактора некроза опухоли - этанерцепт (Enbrel®, адалимумаб (Humira®), а также инфликсимаб (Remicade®), блокирующие костимуляцию Т-клеток агенты -абатацепт (Orencia®), агенты, понижающие количество В-клеток - ритуксимаб (Rituxan®), ингибиторная терапия рецептора интерлейкина-1 (ИЛ-1) - анакинра (Kineret®), внутримышечное золото, другие иммуномодулирующие и цитотоксические агенты - азатиоприн (Imuran®), циклофосфамид и циклоспорин (Neoral®, Sandimmune®).

Метотрексат в настоящее время считается DMARD препаратом первой линии для большинства пациентов с РА. Он имеет относительно быстрое начало действия в терапевтических дозах (6-8 недель), хорошую эффективность, благоприятный профиль токсичности, он прост при введении и имеет относительно низкую стоимость. Метотрексат эффективен в отношении облегчения признаков и симптомов РА, а также замедления или прекращения процессов повреждения, видимых при рентгенографических исследованиях. Метотрексат эффективен также при многих других формах воспалительного артрита, включая псориатический артрит и другие спондилоартропатии, и его используют при многих других аутоиммунных заболеваниях. Дозировка: при исследовании, сравнивающем метотрексат и этанерцепт в начальной стадии РА, начальная доза метотрексата составляет 10 мг в неделю и увеличивается до 20 мг в неделю на 8-й неделе. Этот режим или режимы дозирования, которые начинаются с более высоких доз (до 15 мг в неделю) с повышением дозы до 20 мг в течение первых трех месяцев теперь приняты в клинической практике. Максимальная доза составляет обычно 25 мг в неделю, но иногда увеличивается в дальнейшем. Метотрексат может быть введён перорально или в виде подкожных инъекций. Последний способ введения может быть удобным для пациентов, которые имеют тошноту, связанную с метотрексатом. Пациентов, которых начали лечить метотрексатом, следует тщательно обследовать на наличие почечной недостаточности, острого или хронического заболевания печени, значительного потребления алкоголя или злоупотребления алкоголем, лейкопении (низкого количества белых клеток крови), тромбо-

цитопении (низкого количества тромбоцитов) или неустранённого дефицита фолиевой кислоты. Совместное введение NSAID с метотрексатом является обычным для пациентов с ревматоидным артритом и считается безопасным ревматологами до тех пор, пока функциональные тесты печени тщательно контролируются. Метотрексат может сочетаться безопасно практически с любыми другими одобренными FDA DMARD для РА, в том числе сульфасалазином, гидроксихлорохином, ингибиторами ФНО, абатацептом, ритуксимабом, анакинрой и лефлуномидом. Во всех клинических испытаниях, сочетающих метотрексат с одним из этих DMARD, никакой неожиданной токсичности или синергической токсичности не наблюдалось, за исключением более высокой токсичности для печени лефлуномида, который также метаболизируется в печени.

Гидроксихлорохин и хлорохин являются противомалярийными препаратами, которые являются относительно безопасными и хорошо переносимыми средствами для лечения ревматоидного артрита. Поскольку эти препараты имеют ограниченную способность предотвращать повреждение суставов сами по себе, их использование, вероятно, должно быть ограничено у пациентов с очень легкой и неэрозивной формой заболевания. Гидроксихлорохин иногда сочетают с метотрексатом для совместного аддитивного эффекта при признаках и симптомах или как часть режима "тройной терапии" с метотрексатом и сульфасалазином.

Сульфасалазин (Azulfidine®) является эффективным DMARD для лечения РА. Его используют совместно с метотрексатом и гидроксихлорохином как часть режима "тройной терапии", который применяется для достижения улучшений у пациентов, которые имели неадекватные ответы на метотрексат сам по себе. Сульфасалазин также используют при лечении воспалительных заболеваний кишечника и спондилоартропатий. Механизм его действия при РА неизвестен. Некоторые из его эффектов могут быть вызваны недостатком фолиевой кислоты. Дозировка: обычная доза составляет 2-3 г в день при приёме два раза в день. Начальная доза может составлять 1 г в день и затем повышаться в зависимости от переносимости.

Лефлуномид (Arava®) также является эффективным DMARD. Его эффективность подобна таковой метотрексата с точки зрения признаков и симптомов, и он является хорошей альтернативой для пациентов, которым не подошёл или которые не переносят метотрексат. Было продемонстрировано, что лефлуномид замедляет прогрессирование, судя по рентгенографическим снимкам. Исследования показали, что он также может с осторожностью сочетаться с метотрексатом у пациентов без предшествующих заболеваний печени при условии, что функции печени тщательно контролируются. Лефлуномид также изучали в отношении его применения при псориатическом артрите, и была продемонстрирована некоторая эффективность. Дозировка: время полужизни активного метаболита лефлуномида очень длительное. Лефлуномид и его метаболиты в значительной степени связываются с белками и подвергаются дальнейшему метаболизму до выведения. При использовании впервые препарат применяют в дозе 100 мг день в течение трех дней нагрузки, после чего доза составляет 20 мг ежедневно. Из-за значительного количества желудочно-кишечных побочных эффектов и диареи большинство практикующих врачей в настоящее время используют более короткий период нагрузки с более низкими дозами или начинают лечение с 10-20 мг/сутки без дозы нагрузки. Доза может быть уменьшена до 10 мг ежедневно, если препарат не переносится в дозе 20 мг.

Ингибиторы фактора некроза опухоли (ФНО): ФНО находится в больших количествах в ревматоидном суставе и производится локально в суставе синовиальными макрофагами и лимфоцитами, инфильтрирующими синовиальную оболочку суставов. ФНО является одним из важных цитокинов, который опосредует повреждения и разрушения суставов из-за его активности во многих клетках сустава, а также в других органах и системах организма. ФНО антагонисты были первыми из биологических DMARD, которые были одобрены для лечения РА, а также были отнесены к модификаторам биологической реакции или "биопрепаратам", чтобы отличать их от других DMARD, таких как метотрексат, лефлуномид или сульфасалазин. Три антагониста ФНО одобрены для лечения РА, а дополнительные агенты разрабатываются. Эти препараты схожи по их эффективности в отношении облегчения признаков и симптомов РА, замедления или прекращения повреждений, обнаруживаемых рентгенографическими способами и улучшения функции и качества жизни. Эти агенты также теперь одобрены для лечения других форм воспалительного артрита, включая псориатический артрит, ювенильный идиопатический артрит и болезнь Бехтерева. В настоящее время есть три ингибитора ФНО, одобренные FDA для лечения РА (перечислены в порядке их одобрения): этанерцепт (Enbrel®), инфликсимаб (Remicade®) и адалимумаб (Humira®).

Этанерцепт (Enbrel®) является эффективным в отношении облегчения признаков и симптомов ревматоидного артрита, а также замедления или прекращения повреждений, обнаруживаемых рентгенографическими способами, при использовании в качестве монотерапии или в комбинации с метотрексатом. Этанерцепт также одобрен для лечения псориатического артрита и болезни Бехтерева, а также псориаза.

Этанерцепт представляет собой слитый белок, который сочетает в себе два внеклеточных связывающих домена p75-формы рецептора ФНО и Fc-фрагмент молекулы антитела IgG1 человека. Компоненты белка полностью человеческие, и анти-антитела к этанерцепту появляются относительно редко.

Дозировка: наиболее распространенная доза, используемая в настоящее время, составляет 50 мг для самовведения один раз в неделю в виде подкожных инъекций. Доступны заполненные шприцы и система автоинъекций (SureClick®). Этанерцепт также доступен в дозе 25 мг, которую вводят два раза в неделю. Периодичность или время между введениями не изучены. Существует ограниченная информация о безопасности или эффективности при дозах выше 50 мг в неделю. Время полужизни этанерцепта составляет 70 ч при дозе 25 мг.

Инфликсимаб (Remicade®): в комбинации с метотрексатом одобрен для лечения РА и для лечения псориатического артрита и болезни Бехтерева, а также псориаза и болезни Крона. Инфликсимаб представляет собой химерное моноклональное антитело, которое связывает ФНО с высоким сродством и специфичностью. Сайт связывания ФНО антитела имеет мышиное происхождение, а остальные 75% антитела инфликсимаба происходят из последовательности антитела IgG1 человека. Инфликсимаб эффективен в качестве монотерапии для облегчения признаков и симптомов РА, но могут появиться анти-инфликсимаб антитела, которые, в свою очередь, сокращают длительность ответа. Совместное применение с метотрексатом снижает частоту появления этих антител и поэтому рекомендуется. Сочетание инфликсимаба и метотрексата является очень эффективным в отношении снижения клинических проявлений заболевания, а также замедления или остановки прогрессирования изменений, обнаруживаемых способом радиографического исследования при РА. Дозировка: инфликсимаб вводят внутривенно. Введение обычно занимает 2-3 часа. Рекомендуемая стартовая доза инфликсимаба составляет 3 мг/кг для РА, которую вводят в виде внутривенной инфузии с последующим дополнительным дозированием на 2- и 6-й неделях, затем каждые 8 недель после этого. Инфликсимаб следует вводить в комбинации с метотрексатом. Если клинический ответ является неадекватным в начальной дозе, доза инфликсимаба может быть увеличена постепенно до максимальной дозы 10 мг/кг, а частота - до 1 раза каждые 4-6 недель.

Адалимумаб (Humira®) является полностью человеческим анти-ФНО моноклональным антителом с высокой специфичностью к ФНО. Как и другие антагонисты ФНО, он эффективен в качестве монотерапии и в комбинации с метотрексатом в отношении облегчения признаков и симптомов РА, а также замедления или остановки прогрессирования изменений, обнаруживаемых способом радиографического исследования при РА. Его вводят путем подкожной инъекции каждые две недели, но доза может быть увеличена до 1 раза в неделю, если это необходимо. Адалимумаб эффективен при РА, псориатическом артрите, болезни Бехтерева и болезни Крона. Дозировка: адалимумаб в настоящее время доступен в дозе 40 мг в виде инъекций для подкожного (SC) самовведения раз в две недели. Существуют заполненные шприцы, а также система для автоинъекций (Huimira Pen®). Если ответ на такую дозу является недостаточным, частота инъекций может быть увеличена до одного раза в неделю. Адалимумаб имеет время полужизни около 2 недель (в пределах 10-20 дней) после стандартной дозы 40 мг.

Блокада костимуляции Т-клеток: абатацепт (Orencia®): абатацепт является первым представителем класса агентов, известных как блокаторы костимуляции Т-клеток. Такие агенты мешают взаимодействию антигенпрезентирующих клеток и Т-лимфоцитов и воздействуют на ранние стадии патогенного каскада событий при ревматоидном артрите. Стимулы, за счёт которых происходит активация Т-лимфоцитов, неизвестны, но скорее всего это происходит при взаимодействии с антигеном, представленного в окружении молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Т-клетки распознают антигены как чужеродные и, если они получают второй стимул, становятся активными, размножаются, направляются в воспаленные районы и выделяют провоспалительные цитокины, в том числе ФНО. Один из важных сигналов "второго стимула" для активации Т-клеток опосредуется молекулами CD80 и CD86, найденными на антигенпрезентирующих клетках, и молекулами CD28 на поверхности Т-клеток. Дозировка: абатацепт вводят путем внутривенной инфузии один раз в месяц после первоначальных доз в начале исследования на 2-и 4-й неделе. Доза зависит от веса тела: для больных с весом <60 кг - 500 мг, 60-100 кг - 750 мг и >100 кг - 1000 мг. Препарат вводят в течение от около 30 мин до 1 ч.

Понижение количества В-клеток: ритуксимаб (Rituxan®): В-клетки являются важными клетками воспаления с множеством функций в иммунном ответе. Они служат в качестве антигенпрезентирующих клеток, могут секретировать цитокины и дифференцироваться в плазматические клетки, производящие антитела. Было показано, что снижение количества В-клеток является эффективным в отношении облегчения признаков и симптомов РА и замедления прогрессирования изменений, обнаруживаемых способом радиографического исследования при РА. Агент, понижающий количество В-клеток, ритуксимаб, в настоящее время доступен для лечения ревматоидного артрита. Ритуксимаб (Rituxan®) был первоначально разработан для лечения неходжкинской лимфомы и был использован для лечения этого злокачественного состояние лимфоцитов и лимфатических узлов в течение нескольких лет. В ранних исследованиях у пациентов с ревматоидным артритом было показано, что ритуксимаб вызывал быстрое и устойчивое снижение количества циркулирующих В-клеток в крови, а также приводил к клиническим улучшениям у многих пациентов. Дальнейшие клинические исследования продемонстрировали, что ритуксимаб является эффективным в отношении облегчения признаков и симптомов РА, а также замедления или остановки прогрессирования изменений, обнаруживаемых способом радиографического исследования у

пациентов с РА, которым не помогла терапия другими DMARD. Агент в настоящее время одобрен в США, однако, только для пациентов, которым не помогли антагонисты ФНО. Дозировка: утвержденная в настоящее время доза составляет 1000 мг, вводимая внутривенно в течение 3-4 ч двумя дозами с перерывом в 2 недели. Пациенты обычно получают кортикостероиды внутривенно с каждой инфузией и предварительным лечением димедролом и ацетаминофеном. Оптимальное время для очередного введения пока не выяснено. Некоторые выступают за фиксированный режим дозирования каждые 6 месяцев, в то время как другие считают, что необходимо ждать, пока у пациента не начнется обострение перед очередным введением. Исследования ведутся для определения режима введения препарата. Не обнаружено явной корреляции между степенью и продолжительностью снижения количества В-клеток и эффективностью. Также не удалось обнаружить корреляции между восстановлением нормального уровня В-клеток и потерей эффективности.

Интерлейкин-1 (IL-1) является еще одним провоспалительным цитокином, участвующим в патогенезе ревматоидного артрита. Антагонист рецептора IL-1 (IL-1ra) является эндогенным блокатором цитокина. Доказательства, подтверждающие противовоспалительное действие IL-1ra in vivo, показаны на модели IL1ra-дефицитных мышей, у которых спонтанно развивались аутоиммунные заболевания, подобные ревматоидному артриту, а также васкулиту. IL-1 влияет на деградацию хряща, приводящую к повреждению, а также ингибирует его восстановление, и является мощным стимулом для остеокластов, приводящих к эрозии кости. Антагонист рецептора IL-1 анакинра (Kineret®) в настоящее время одобрен для лечения РА. Другие агенты были изучены также в отношении РА.

Анакинра (Kineret®), рекомбинантный антагонист рецептора IL-1 человека (hu rIL-1ra), одобрен для лечения РА. Анакинра может быть использована отдельно или в сочетании с другими DMARD, отличными от агентов, блокирующих ФНО (этанерцепт, инфликсимаб, адалимумаб). Анакинра не рекомендуется для использования в комбинации с ингибиторами ФНО, поскольку исследования показали усиление заболевания без аддитивного клинического эффекта. Дозировка: рекомендуемая доза анакинра составляет 100 мг в сутки, которую вводят ежедневно в виде подкожных инъекций. Дозу следует вводить примерно в одно и то же время каждый день. Система самовведения доступна для этого препарата.

Внутримышечное золото эффективно при лечении ревматоидного артрита. Внутримышечные соли золота до 1990-х гг. были наиболее используемыми препаратами DMARD, но были заменены на Метотрексат и другие DMARD как более предпочтительные препараты для лечения РА. Доступны два соединения для инъекций (Myochrysine® и Solganal®). Соединения золота редко используются в настоящее время из-за их многочисленных побочных эффектов, требований к мониторингу, ограниченной эффективности и очень медленному началу действия. Соединения соли для орального применения (Auranofin®) также доступны, но их эффективность является еще более ограниченной, чем у инъецируемых соединений. Дозировка: терапия с применением Миокринозина или Солганала начинается с дозы 10 мг внутримышечно, 25 мг затем дается на второй неделе, затем 50 мг дается каждую последующую неделю до тех пор, пока не возникнет ответ или пока суммарно не будет дано 1 г препарата. Если есть положительный ответ, терапию сокращают до принятия 50 мг в каждые две недели в течение трех месяцев, затем в каждые три недели в течение трех месяцев и затем, наконец, до соблюдения ежемесячной дозы. Отсутствие ответа после принятия суммарно 1 г препарата следует рассматривать как несостоятельность лечения. Ежемесячное принятие золота должно быть продолжено в течение жизни.

Другие иммуномодулирующие и цитотоксические препараты: Наиболее широко используемыми цитотоксическими препаратами являются азатиоприн (Imuran®), циклоспорин А (Sandimmune®, Neoral®), циклофосфамид (Cytoxan®) и d-пеницилламин. Вследствие потенциально высокой токсичности, эти препараты, как правило, используются для лечения опасных для жизни, внесуставных симптомов РА, таких, как системный васкулит, или тяжелых заболеваний суставов, не поддающихся другой терапии.

Азатиоприн (Imuran®) обладает некоторой активностью в лечении ревматоидного артрита, но на наблюдение эффекта может понадобиться 8-12 недель. Это аналог пурина, который может вызывать подавление работы костного мозга и уменьшение числа клеток крови (белых кровяных телец, красных кровяных телец и кровяных пластинок), особенно у пациентов с почечной недостаточностью или при использовании совместно с аллопуринолом или ингибиторами АСЕ. Повышенный риск возникновения вторичных раковых заболеваний, обусловленных применением азатиоприна, является спорным фактом. Рекомендуется сделать скрининг уровня содержания фермента тиопурин метилтрансферазы (ТПМТ) до начала терапии с применением азатиоприна. У некоторых людей наблюдается недостаток этого фермента, осуществляющего метаболизм азатиоприна, и, как следствие, повышенный риск токсичности данного лекарства. Побочные эффекты включают тошноту и возникновение алопеции. Анализы крови, чтобы контролировать показатели крови, и тесты на нормальное функционирование печени необходимы для пациентов, принимающих азатиоприн.

Циклоспорин (Sandimmune®, Neoral®) обладает некоторой активностью в качестве модифицирующей заболевание терапии при ревматоидном артрите. Исследования демонстрируют, что прием циклоспорина может сочетаться с приемом метотрексата у пациентов с РА для получения положительного

клинического ответа. Это иммунодепрессант, одобренный для предотвращения отторжение почечного или печеночного трансплантата, а также обладает активностью в лечении псориаза и других аутоиммунных заболеваний. Циклоспорин ингибирует работу Т-клеток с помощью ингибирования транскрипции интерлейкина-2. Основные токсические эффекты включают инфекцию и почечную недостаточность. Повышение кровяного давления является общим побочным эффектом и может потребовать лечения. Тщательный контроль функционирования почек и кровяного давления необходим на протяжении всего времени принятия пациентом циклоспорина. Многочисленные взаимодействия с другими принимаемыми лекарствами могут повлиять на содержание циклоспорина в крови и привести к большей токсичности препарата. Во вкладыше содержится важная информация, касающаяся взаимодействия с лекарствами. Циклоспорин повышает риск инфекции и может также повышать риск заболеваний, включая лимфому.

Циклофосфамид (Cytoxan®) является мощным иммунодепрессантом, используемым при тяжелых случаях рефрактерного ревматоидного артрита и случаях с осложнениями, такими как васкулит. Он используется также при лечении других аутоиммунных состояний, включая волчанку и васкулит. Циклофосфамид является алкилирующим агентом с серьезными токсическими эффектами, включая угнетение функции костного мозга, геморрагический цистит, преждевременное угасание функций яичников, инфекции и вторичные раковые заболевания, особенно повышен риск развития рака мочевого пузыря. Тщательный контроль анализов крови необходим при данном лечении.

d-Пеницилламин (Cuprimine®, Depen®) исторически обладает некоторой активностью в лечении ревматоидного артрита. Его назначают в первую очередь пациентам с персистирующим, агрессивным заболеванием, которое не излечимо с помощью других доступных препаратов DMARD. Как и золото, это относительно токсичный препарат, ограниченно применяемый, в связи с вопросами переносимости и эффективности, кроме того, не столь мощный, как другие доступные в настоящее время препараты. Основными побочными эффектами являются сильная сыпь и воздействие на функцию почек. Тщательный контроль функций почек необходим при данном лечении. При приеме d-пеницилламина у пациентов могут развиваться заболевания, подобные волчанке, или другие аутоиммунные заболевания.

Другие соединения DMARD, находящиеся на стадии разработки в настоящий момент, могут также применяться в комбинациях в способах лечения согласно изобретению, например, такие как VX-702, окрелизумаб, соединения, мишенями которых являются SYK киназы, такие как фостиматиниб (R788) и ингибиторы JAK1, JAK2, такие как INCB28050, танезумаб или тасоцитиниб (CP-690,550).

Соединения DMARD могут быть выбраны из группы, содержащей микофенолат мофетил (CellCept), ингибиторы кальциневрина, циклоспорин, сиролимус, эверолимус, оральные ретиноиды, азатиоприн, эфиры фумеровых кислот, D-пеницилламин, циклофосфамид, иммуноадсорбционные колонки, колонки Prosorba(r), соли золота, ауранофин, ауротиомалат натрия (Миокризин), гидроксихлорохин, хлорохин, лефлюномид, метотрексат (MTX), миноциклин, сульфасалазин (SSZ), блокаторы факторов некроза опухоли альфа (ФНОα), этанерцепт (Enbrel), инфликсимаб (Remicade), адалимумаб (Humira), цертолизумаб пегол (Cimzia), голимумаб (Simponi), блокаторы интерлейкина 1 (ИЛ-1), например, анакинра (Kineret), моноклональные антитела на В-клетки, ритуксимаб (Rituxan), блокаторы костимуляции Т-клеток, абатацепт (Orencia), блокаторы интерлейкина-6 (ИЛ-6), тоцилизумаб, РоАктемра и Актемра.

Лечение с помощью анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антител.

Пациент, страдающий РА, может характеризоваться наличием, стадией, развитием или тяжестью заболевания. В некоторых случаях получают биологический образец (например, синовиальную жидкость) и оценивают его на наличие провоспалительных медиаторов или других маркеров активного воспаления и/или наличие Т-клеток (например, $CD4^+$ Т-клеток). В одном варианте детектируют наличие аутоантител, например, проводят детекцию ревматоидного фактора (RhF), антител к циклическому цитруллинированному пептиду, анти-оцРНК, анти-дцРНК, анти-Smith, антифосфолипид, антиядерных и/или анти-актиновых антител. В одном варианте способы включают оценку уровня протеолитического фермента, воспалительного медиатора, маркера текущего воспаления или провоспалительного цитокина. В одном варианте способы включают определение уровня С-реактивного белка (CRP) и/или скорости оседания эритроцитов. Определение наличия у пациента РА или детекция (например, в воспаленной ткани) провоспалительных медиаторов или других маркеров активного воспаления и/или Т-клеток (например, наличие Т-клеток HLA-cw3 и/или cw4 положительных Т-клеток), определение заболевания, как острого, хронического, со вспышками или прогрессирующего, указывает на необходимость лечения пациента с использованием анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антител.

Пациент с РА, и необязательно страдающий активным воспалением и/или устойчивым или хроническим РА, и/или испытывающий вспышки, может лечиться анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антителами. Предпочтительно устойчивый РА может быть охарактеризован как РА, прогрессировавший больше года или прогрессировавший меньше года, но устойчивый к лечению основными модифицирующими заболевание анти-ревматоидными препаратами (DMARD). Устойчивость РА можно также оценить, используя DAS или CAS критерии. "РА и родственные заболевания" относится к заболеваниям, которые могут вызывать или быть следствием развития ревматоидного артрита, такие как, например, эписклеротом, пневмоторакс, эмболия и ишемическая язва кожи.

Антитела в соответствии с изобретением вводят в сочетании с другими препаратами от РА, такими как перечислено ранее.

Анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела вводят посредством инъекции или инфузии подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутрисуставно, интрасиновиально, интрастернально, интратекально, внутрипеченочно, внутрь повреждения и интракраниально. Как вариант, анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела могут быть введены внутрь сустава, предпочтительно непосредственно в место воспаления.

Рассеянный склероз.

Рассеянный склероз (РС) - это хроническое воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), при котором повреждаются липидные миелиновые оболочки вокруг аксонов в головном и спинном мозге, что приводит к демиелинизации и рубцеванию, а также широкому спектру признаков и симптомов.

Патофизиологическая причина остается невыясненной, хотя различные теории свидетельствуют о генетической или инфекционной причине. Различные факторы риска окружающей среды также могут иметь влияние. Клинические проявления связаны с проникновением в центральную нервную систему иммунокомпетентных клеток. На периферии обнаруживаются специальные популяции Т-клеток против невроантигенов, таких как основной белок миелина. Почти каждый неврологический симптом может появиться с появлением заболевания и часто прогрессирует до физической и умственной инвалидности. РС прогрессирует в виде двух форм: новые симптомы появляются в виде отдельных приступов (рецидивирующие формы) или медленно накапливаются в течение времени (прогрессирующие формы). Между приступами симптомы могут абсолютно не проявляться, но неврологические проблемы постоянно возникают, особенно когда болезнь прогрессирует.

Развитие заболевания и его оценка.

Описано несколько подтипов или типов развития. В процессе выделения подтипов используют предшествующее течения заболевания, чтобы предсказать его развитие в будущем. Они важны не только для прогноза, но и для принятия терапевтических решений. В 1996 году Национальное общество по борьбе с рассеянным склерозом США определило стандарты для четырех подтипов: рецидивирующе-ремиттирующий, вторичный прогрессирующий, первичный прогрессирующий и прогрессирующий рецидив.

Рецидивирующе-ремиттирующий подтип характеризуется непредсказуемыми рецидивами и следующими за ними периодами ремиссии длительностью от нескольких месяцев до нескольких лет без проявлений признаков активности заболевания. Это характеризует начальное течение заболевания у 80% людей с РС. Вторичным прогрессирующим РС страдают около 65% людей с начальным рецидивирующе-ремиттирующим РС, у которых затем началось прогрессирующее неврологическое расстройство между острыми приступами без определенных периодов ремиссии. Встречаются случаи рецидивов и незначительных ремиссий. Среднее время между началом заболевания и переходом РС от рецидивирующе-ремиттирующей к вторичной прогрессирующей стадии составляет 19 лет. К обладателям первичного прогрессирующего подтипа относят примерно 10-15% людей, у которых никогда не было ремиссии после начальных симптомов РС. Он характеризуется прогрессирующим расстройством дееспособности с отсутствием или наличием только случайных или незначительных ремиссий и улучшений. Возраст, при котором начинает развиваться первичный прогрессирующий подтип, обычно больше, чем таковой для рецидивирующе-ремиттирующего, но примерно одинаков с возрастом, при котором происходит переход между рецидивирующе-ремиттирующим и вторичным прогрессирующим подтипом. В обоих случаях это около 40 лет. Прогрессирующим рецидивирующим РС характеризуются люди, которые сначала имеют устойчивое неврологическое расстройство, но также страдают от явных накладывающихся по времени приступов. Это наименее распространенный из всех подтипов. Рассеянный склероз развивается как прогрессирующее неврологическое расстройство или характеризуется острыми приступами или расстройство сочетается с приступами, в зависимости от типа РС. Симптомы РС включают усталость, проблемы со зрением, такие как размытое или двойное зрение, покалывание, онемение, жжение, мышечную слабость, скованность, тремор и спазмы, проблемы при ходьбе, дисфункцию мочевого пузыря и кишечника, сексуальную дисфункцию, умственное расстройство и проблемы с памятью, проблемы с глотанием и речью, боли или депрессию. Во время приступов симптомы усиливаются, и общее состояние пациента ухудшается. Описаны типичные варианты РС с нестандартным поведением; они включают болезнь Девича, концентрический склероз Бало, диффузный склероз Шилдера и рассеянный склероз Марбурга.

Диагностика рассеянного склероза основана на использовании различных критериев. Исторически широко используется критерий Шумахера и Позера. В настоящее время критерий МакДональда, установленный Национальным обществом по борьбе с рассеянным склерозом США, при котором используют магнитную резонансную томографию, стремится заместить более старый критерий. (McDonald WI, Compston A., Edan G., et al. (2001), Ann. Neurol. 50(1): 21-7).

Современные методы лечения.

Есть много проблем, которые необходимо учитывать пациенту и врачу при лечении рассеянного склероза. Основные задачи включают увеличение скорости восстановления после приступов (например, лечение стероидными препаратами); уменьшение количества приступов или количества очагов на МРТ;

замедление прогрессировала заболевания (лечение с помощью модифицирующих заболевание препаратов, или DMD), и один дополнительный пункт состоит в избегании осложнений, ведущих к потере функционирования пораженных органов.

Многие неврологи начинают лечение с помощью модифицирующих заболевание препаратов при постановке диагноза "рецидивирующе-ремиттирующий рассеянный склероз". Многие начинают лечение после первого приступа рассеянного склероза, хотя клинические исследования показали, что пациенты с задержкой лечения не получают того преимущества, которое получают пациенты, рано начавшие лечение.

Пациенты получают иммуносупрессивную терапию, включая азатиоприн и кортикостероиды для ограничения степени воспалительного процесса. Иммуносупрессивная терапия рассеянного склероза тем не менее дает только частичный эффект и во многих случаях только обусловливает задержку в развитии заболевания, несмотря на противовоспалительное и иммуносупрессивное лечение. Используемые в настоящее время модифицирующие заболевание препараты против РС включают в частности ИФНβ-1a (Avonex®, CinnoVex®, ReciGen®, Rebif®), ИФНβ-1b (Betaseron®, Betaferon®), глатирамер ацетат (Copaxone®), который не является интерфероном, нестероидный иммуномодулятор, митоксантрон, иммуносупрессант, натализумаб (Tysabri®), финголимод (Gilenia®). Некоторое количество способов лечения в настоящее время исследуется. Новые средства против РРРС, показавшие положительный эффект во второй фазе исследований, включают алемтузумаб (Campath®), даклизумаб (Zenapax®), ритуксимаб, дирукотид, BHT-3009, кладрибин, диметил фумарат, эстриол, финголимод, лакинимод, миноциклин, статины, темсиролимус и терифлуномид.

Лечение с использованием анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител.

Первым возможным шагом является оценка заболевания пациента. Затем пациент получает должное лечение анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антителами. У пациента с РС может быть оценено наличие, стадия, прогресс и тяжесть заболевания. Преимущественно пациент с активным воспалительным процессом, и/или устойчивой или хронической формой РС, и/или подверженный приступам проходит лечение с использованием анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антител. Предпочтительно устойчивый РС может быть охарактеризован как РС с прогрессирующим неврологическим упадком, как при вторичном прогрессирующем, первичном прогрессирующем или прогрессирующем рецидивирующем типе заболевания, альтернативно, "устойчивым РС" называется РС, прогрессирующий более года или прогрессирующий менее года, но устойчивый к действию первичного лечения. Предпочтительно приступы определяются как обострение симптомов, связанных с рассеянным склерозом; такие приступы ведут к упадку общего состояния пациента. Другим аспектом изобретения является создание композиции, способной лечить РС или ослабить или предотвратить приступы РС, тем самым приводя к улучшению здоровья и состояния пациента.

В одном варианте антитела согласно изобретению вводят в сочетании с другими препаратами против РС, как те, что перечислены ранее.

Анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела могут быть введены при помощи инъекции или инфузии подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутрисуставно, внутрисиновиально, интрастернально, интратекально, внутрипеченочно, интракраниально путь или в очаг поражения.

Хронические воспалительные заболевания кишечника (CIDI) - болезнь Крона - Ректоколит.

Хронические воспалительные заболевания кишечника - это серия заболеваний, поражающих желудочно-кишечный тракт. Наиболее широко встречающиеся CIDI - это язвенный колит, болезнь Крона, воспалительные заболевания кишечника, регионарный энтерит, ректоколит и гранулематозный энтероколит.

Развитие заболевания и его оценка.

Диагностические тесты включают неинвазивные лабораторные тесты (тесты на анемию и инфекцию, на функцию печени для оценки проблем с печенью и желчными протоками, и анализы кала для оценки бактериальных, вирусных и паразитарных инфекций), эндоскопию, эндоскопическое ультразвуковое исследование (ЭУЗ), капсульную эндоскопию, радиологические исследования, например мультифазную КТ энтерографию, МР энтерографию (МРЭ).

Хронические воспалительные заболевания кишечника довольно трудно оценить. При ректоколите колоскопия может обеспечить довольно полный обзор ран в толстой кишке, но при болезни Крона, поскольку раны могут возникать повсюду, от пищевода до прямой кишки, состояние пациента намного сложнее оценить. Была создана специальная шкала оценок для оценивания болезни Крона: индекс активности болезни Крона (SDAI, см. обзор Sandbom W.J. et.al. Gastroenterology, 2002; 112:512). Значение индекса варьирует от 0 до 600. До 150 баллов состояние пациента оценивается как "очень хорошее". Между 150 и 219 баллами течение болезни малоактивно, между 220 и 449 - течение болезни умеренно активно. При около 450 баллах болезнь оценивается как очень тяжелая. Тем не менее такая оценка может зависеть и от состояния пациентов, и, кроме того, чаще используется другая система оценки, Оценка Повреждения Пищеварительного тракта при болезни Крона (CD3S) или оценка Леманна, эта система была установлена для оценки состояния пациентов с использованием более точных научных параметров, например оценка на основе томоденситометрии (Pariente B. et al. Development of the Crohn's Disease Digestive

Damage score, the Lemann score Innflamm Bowel Dis 2010; Nov 28).

Болезнь Крона сопровождается кризисными состояниями, известными также как вспышки. Вспышки могут быть легкими или тяжелыми, кратковременными или долгими. Такие вспышки или приступы могут быть связаны со значением индекса SDAI более 150, более 219, более 419 баллов. Тяжелые вспышки могут привести к сильной боли, обезвоживанию и потере крови. Периодические воспаления обычно могут появляться в том же районе кишечника, но могут распространяться на соседние участки после того, как пораженный участок был удален хирургическим путем. Когда болезнь Крона вызывает обострение желудочно-кишечных симптомов, человек может также страдать от воспаления суставов (артрит), воспаления белков глаз (эписклерит), язв в полости рта (афтозный стоматит), воспаления кожных узелков на руках и ногах (эритемы) и сине-красных язв кожи, содержащих гной (гангренозная пиодермия). Даже когда болезнь Крона не вызывает вспышек желудочно-кишечных симптомов, человек может страдать от гангренозной пиодермии, в то время как воспаление позвоночника (болезнь Бехтерева), воспаление тазовых суставов (сакроилеит), воспаление внутри глаза (увеит) или воспаление желчных протоков (в первую очередь, склерозирующий холангит) могут возникать вне зависимости от клинической активности заболевания кишечника.

Современные методы лечения.

В настоящее время в число мероприятий при лечении входят контролирование симптомов, поддержание ремиссии и предотвращение возникновения рецидивов. Лечение болезни Крона включает, во-первых, лечение явных симптомов болезни, а во-вторых, поддержание ремиссии. Лечение предполагает использование лекарств, чтобы исключить инфекции, в основном антибиотиков, и уменьшить воспаление, в основном аминосалициловых противовоспалительных препаратов и кортикостероидов. Хирургическое вмешательство может потребоваться при осложнениях, таких как закупорки и нагноения, или если не наблюдается ответа на лекарственные препараты в разумные сроки.

Аминосалициловые противовоспалительные препараты включают Мезалазин или мезаламин (Lialda®, Asacol®, Pentasa®, Salofalk®, Dipentum® и Rowasa®), Сульфалазин, который превращается в 5-ASA и сульфапиридин кишечными бактериями. Сульфапиридин может оказывать некоторый терапевтический эффект при ревматоидном артрите. Тем не менее сульфапиридиновая составляющая часто является лимитирующим фактором при лечении болезни Крона из-за возникающих побочных эффектов. Соединения 5-ASA показаны к применению в случаях легкой и умеренной болезни Крона. Они обычно употребляются в качестве терапии первой линии при заболеваниях подвздошной кишки и правой стороны толстой кишки из-за менее выраженных побочных эффектов, по сравнению с кортикостероидами.

Кортикостероидные противовоспалительные препараты.

Стероидные клизмы могут использоваться для лечения симптомов ректального заболевания. Кортикостероиды представляют собой класс противовоспалительных препаратов, используемых в первую очередь для лечения умеренных и тяжелых вспышек или приступов болезни Крона. Их используют умеренно в связи с доступностью эффективных препаратов с менее выраженными побочными эффектами. Наиболее часто назначаемым оральным стероидом является преднизон, который обычно вводят в дозе 0,5 мг/кг для индукции ремиссии. Внутривенные стероиды используют в случае устойчивости к оральным стероидам или в случае невозможности принятия оральных стероидов. Из-за того, что кортикостероиды ослабляют устойчивость к инфекциям, уход должен обеспечить уверенность в отсутствии активных инфекций, особенно внутрибрюшного абсцесса до начала стероидной терапии. Будесонид является оральным кортикостероидом с ограниченным поглощением и высоким уровнем пресистемного метаболизма, т.е. меньшие количества стероида попадают в кровяное русло. Показано его эффективное применение при лечении болезни Крона от легкой до умеренной и при поддержании ремиссии при болезни Крона. В виде препарата Entocort®, будесонид высвобождается в подвздошной и правой толстой кишке и оказывает основной эффект против заболевания в этой области. Будесонид также используют в комплексе с антибиотиками для лечения активной формы болезни Крона.

Меркаптопуриновые иммуносупрессивные препараты.

Азатиоприн представлен в виде таблеток, является щадящим стероидным иммунодепрессантом первой линии. Азатиоприн и 6-меркаптопурин (6-МП) являются наиболее используемыми иммунодепрессантами при поддерживающей терапии болезни Крона. Они являются пуриновыми антиметаболитами, т.е. они препятствуют синтезу пуринов, необходимых для воспалительных клеток. Продолжительность их работы измеряется месяцами, что делает их неудобными для индукции ремиссии. Дозировка обоих препаратов составляет от 1,5 до 2,5 мг/кг, причем данные литературы поддерживают использование больших доз. Показаниями к применению азатиоприна и 6-МП являются поддерживающая терапия людей, зависимых от стероидов, фистулизирующие заболевания, индукция ремиссии при заболевании, не поддающемся лечению стероидами, поддержание ремиссии после операции при болезни Крона. Азатиоприн, тем не менее, является особо опасным препаратом, при приеме которого возможно заражение потенциально летальными инфекциями, занесенным FDA в перечень как канцероген для человека.

Инфликсимаб, реализуемый как Remicade®, представляет собой мышино-человеческие химерные антитела, мишенями которых являются факторы некроза опухоли, цитокины при воспалительном ответе. Это моноклональные антитела, ингибирующие провоспалительный цитокин фактор некроза опухоли альфа. Препарат вводят внутривенно и дозируют в расчете на массу, начиная от 5 мг/кг и более, в соответствии с характером заболевания. Инфликсимаб применяют при поддержании ремиссии у людей с болезнью Крона, индукции ремиссии у людей с болезнью Крона, поддержании при фистулизирующей болезни Крона. Побочные эффекты инфликсимаба, как и других иммунодепрессантов ФНО-класса, могут быть серьезными и потенциально смертельными, и на этикетке инфликсимаба стоит значок FDA об особой опасности. Перечисленные побочные эффекты включают гиперчувствительность и аллергические реакции, риск реактивации туберкулеза, сывороточную болезнь и риск возникновения рассеянного склероза.

Адализумаб, известный на рынке как Humira®, как и инфликсимаб, представляет собой антитела против фактора некроза опухоли. Было показано, что Адализумаб ослабляет признаки и симптомы и показан к лечению умеренной и тяжелой болезни Крона (БК) у взрослых, не поддающейся лечению традиционным препаратами и устойчивой к воздействию инфликсимаба, или при непереносимости инфликсимаба.

Натализумаб, известный на рынке как Tysabri®, представляет собой анти-интегриновые моноклональные антитела, применяемые в качестве индукционных или поддерживающих лекарственных препаратов при умеренной и тяжелой форме болезни Крона. Натализумаб может быть применен для лечения пациентов, не отвечающих на лекарственные препараты, блокирующие фактор некроза опухоли альфа, такие как инфликсимаб.

Лечение с помощью анти-KIRZDL 1, 2 и/или 3 антител.

Одним из аспектов изобретения является обеспечение композиции, способной лечить болезнь Крона, возможно, устойчивую болезнь Крона. В данном изобретении термин "устойчивая болезнь Крона" обозначает болезнь Крона, признанную таковой более года назад.

Другим аспектом изобретения является обеспечение способа лечения для уменьшения или предотвращения приступов болезни Крона, ведущего тем самым к улучшению здоровья и состояния пациента. Приступы болезни могут возникать у пациента, имеющего CDAI (индекс активности болезни Крона) более 150, более 219, более 449 единиц. Также настоящее изобретение обеспечивает способ лечения пациентов, страдающих от хронической воспалительной болезни кишечника, включая стадию оценки того, испытывает ли пациент вспышки или приступы, и, если со слов пациента, он испытывает приступы, ему дают эффективное количество анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антител.

Другой аспект изобретения обеспечивает способ профилактического лечения пациента, страдающего болезнью Крона, а также избежания обострений болезни.

В одном варианте антитела в соответствии с изобретением вводят в комбинации с другими препаратами против болезни Крона, такими как было перечислено ранее.

Красная волчанка.

Существует четыре главных типа волчанки - системная красная волчанка, дискоидная красная волчанка, обусловленная лечением красная волчанка и неонатальная красная волчанка. Из всех типов системная красная волчанка является наиболее широко встречающейся и серьезной формой волчанки.

Дискоидная красная волчанка (DLE) представляет собой хроническое заболевание кожи, сопровождаемое язвами, воспалениями и возникновением рубцов преимущественно на лице, ушах, коже головы, но возможно и на других частях тела. Эти поражения развиваются как красные, воспаленные участки с отшелушиванием.

Индуцируемая лекарствами красная волчанка (DIL or DILE) представляет собой аутоиммунное расстройство, обусловленное хроническим использованием некоторых препаратов. Эти препараты вызывают аутоиммунный ответ, запускающий симптомы, сходные с таковыми при СКВ. Известно, что существует 38 препаратов, вызывающих DIL, но только три препарата обусловливают наибольшее число случаев: гидралазин, прокаинамид и изониазид. Пока критерии для диагностики DIL не были окончательно установлены, симптомы DIL обычно описывали как миалгию и артралгию. Как правило, симптомы отступают после прекращения приема препаратов.

Неонатальная красная волчанка представлена у детей, чаще девочек, родившихся от матерей, несущих Ro/SSA антитела. У детей отсутствуют поражения кожи при рождении, но появляются в течение первых недель жизни.

Системная красная волчанка представляет собой хроническое системное аутоиммунное заболевание, которое может повлиять на любую часть тела. Как и при других аутоиммунных заболеваниях, иммунная система атакует клетки тела и ткани, что приводит к воспалению и повреждению тканей. СКВ часто наносит вред сердцу, суставам, легким, кровеносным сосудам, печени, почкам и нервной системе. Течение болезни непредсказуемо, включает периоды болезни (вспышки), чередующиеся с ремиссиями. Заболевание возникает в девять раз чаще у женщин, чем у мужчин, особенно у женщин детородного возраста от 15 до 35 лет, и более широко распространено среди людей неевропейского происхождения. СКВ

поддается лечению путем устранения ее симптомов, главным образом, с помощью циклофосфамида, кортикостероидов и иммунодепрессантов; средство для полного излечения на настоящий момент отсутствует. СКВ может привести к летальному исходу, хотя с последними медицинскими достижениями смертельные случаи случаются редко. СКВ считается неизлечимой, но хорошо поддается терапии. В 1950-х гг. большинство людей с диагнозом СКВ жили менее пяти лет. Достижения диагностики и лечения увеличили выживаемость до того, что более 90% сейчас живет более десяти лет, причем многие могут жить относительно бессимптомно.

Развитие заболевания и его оценка.

Стероиды следует использовать в низкой дозе в течение наиболее короткого возможного периода, чтобы уменьшить негативное воздействие на сердечнососудистую систему, кроме того, желательно использование дополнительных препаратов, способных ослабить симптомы, если это возможно. Высокий уровень сывороточного креатинина, гипертензия, нефротический синдром, анемия и гипоальбуминемия являются неблагоприятными прогностическими факторами. ANA является наиболее чувствительным скрининг-тестом для оценки, в то время как тест на анти-Sm (анти-Smith) антитела является наиболее специфичным. Антитела к дцДНК также довольно специфичны, и их количество часто колеблется в зависимости от активности заболевания; дцДНК титр, как таковой, иногда полезен при наблюдении вспышек заболевания или реакции на лечение.

Некоторые врачи ставят диагноз на основе критериев классификации Американского колледжа ревматологии (ACR). Однако критерии были созданы в первую очередь для использования в научных исследованиях, включая использование в рандомизированных контролируемых испытаниях, требующих более высокой степени доверия, поэтому некоторые люди с СКВ не вполне подпадают под действие критерия.

Американский колледж ревматологии установил 11 критериев в 1982 году и пересмотрел их в 1997 году как инструмент для классификации для упрощения классификации СКВ в клинических испытаниях. Для цели определения пациентов при клинических исследованиях человек страдает СКВ, если представлены любые 4 из 11 симптомов, одновременно или последовательно в двух отдельных случаях: серозит: плеврит или перикардит, оральные язвы, артрит: неэрозивный артрит двух или более периферических суставов, с болезненностью, с отечностью или выпотом, фоточувствительностью, расстройства крови (гематологические расстройства, гемолитическая анемия (низкое количество красных кровяных телец) или лейкопения (количество белых кровяных телец <4000/хмкл) лимфопения (<1500/мкл) или тромбоцитопения (<c100000/мкл) при отсутствии вызывающих ее препаратов, почечная недостаточность, положительный тест на антиядерные антитела; иммунологическое расстройство: положительно анти-Smith, анти-дцДНК, антифосфолипидные антитела, и/или ложный положительный серологический тест на сифилис; наличие анти-оцДНК в 70% случаев, неврологическое расстройство: судороги или психоз, сыпь на переносице и щеках, дискоидная сыпь.

Современные методы лечения.

Лечение СКВ включает в себя предотвращение вспышек и уменьшение их тяжести и длительности при возникновении. Лечение включает кортикостероиды и антималярийные препараты. Конкретные типы волчанкового нефрита, такие как диффузный пролиферативный гломерулонефрит, требуют использования цитотоксических препаратов. В число таких препаратов входят циклофосфамид и микофенолат.

Модифицирующие заболевание противоревматические препараты (DMARDs) используют профилактически для снижения вероятности возникновения вспышек, облегчения течения заболевания и снижения использования стероидов; возникающие вспышки лечат кортикостероидами. Широко используемые DMARD представляют собой антималярийные препараты, такие как плакенил, и иммунодепрессанты (например, метотрексат и азатиоприн). Гидроксихлорохин является последним препаратом, одобренным ВОЗ в 1955 году для лечения волчанки. Анти-BlyS антитела (Benlysta®, Human Genomce Science, Inc.) могут также быть использованы в качестве DMARD. Гидроксихлорохин является антималярийным препаратом и может использоваться для временных кожный и суставных осложнений. Гидроксихлорохин имеет относительно мало побочных эффектов, и было доказано, что гидроксихлорохин увеличивает выживаемость людей с СКВ. Циклофосфамид используют при тяжелом гломерулонефрите или при осложнениях, сопровождаемых повреждением внутренних органов. Некоторые препараты, применяемые для лечения других заболеваний, используют при СКВ "не по прямому назначению"; иммунодепрессанты также используют для контроля заболевания и предотвращения повторения симптомов (вспышек). В зависимости от дозировки, у людей, принимающих стероиды, может развиться синдром Кушинга, побочные эффекты могут включать ожирение, одутловатое круглое лицо, сахарный диабет, повышенный аппетит, расстройства сна и остеопороз. Эти побочные эффекты могут ослабевать, если высокая начальная доза уменьшается, но длительное применение даже низких доз может повышать артериальное давление и вызывать катаракту. Несколько новых иммунодепрессантов против СКВ в настоящее время активно проверяются. Вместо того чтобы подавлять иммунную систему неспецифически, как это делают кортикостероиды, они вызывают ответ отдельных иммунных клеток; анальгетики, например, индометацин и диклофенак, могут применяться в случае, если препараты, отпускаемые без рецепта (в основном нестероидные противовоспалительные препараты) не дают значимого облегчения. Обезболивающие препара-

ты отпускаются при наличии рецепта. Из-за разнообразия симптомов и систем органов, вовлеченных в СКВ, для успешного лечения СКВ у пациента должна быть оценена тяжесть болезни. Легкая или ремиттирующая форма болезни может иногда не подвергаться лечению, не представляя при этом угрозы для здоровья.

Лечение с помощью анти-KIRZDL 1, 2 и/или 3 антител анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела могут использоваться для лечения волчанки, включая устойчивую волчанку, или ослабления или предотвращения вспышек волчанки, улучшая тем самым здоровье и комфорт пациента. "Устойчивая волчанка" представляет собой заболевание волчанкой, прогрессировавшее более года или диагностированное более года назад. В одном варианте антитела в соответствии с изобретением вводят в сочетании с другими препаратами против волчанки, перечисленными выше.

Анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела могут быть использованы для лечения аутоиммунных и воспалительных расстройств, предпочтительно расстройств, в которые вовлечены Т-клетки. Применяются при следующих аутоиммунных и воспалительных заболеваниях: ахлоргидрия, аутоиммунный активный хронический гепатит, острый рассеянный энцефаломиелит, острый геморрагический лейкоэнцефалит, болезнь Аддисона, агаммаглобулинемия, алопеция, боковой амиотрофический склероз, болезнь Бехтерева, анти-GBM/TBM нефрит, антифосфолипидный синдром, антисинтетазный синдром, артрит, атопическая аллергия, атопический дерматит, аутоиммунная апластическая анемия, аутоиммунные кардиомиопатии, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунная периферическая невропатия, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунный полиэндокринный синдром, неопределенный или множественный аутоиммунный прогестероновый дерматит, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура, аутоиммунный увеит, болезнь Бало/концентрический склероз Бало, синдром Бехчета, болезнь Бергера, энцефалит Бикерстаффа, синдром Блау, буллезный пемфигоид, Болезнь Кастлемана, болезнь Шагаса, синдром хронической усталости и иммунной дисфункции, хронические воспалительные демиелинизирующие полинейропатии, хронический рецидивирующий мультифокальный остомиелит, хроническая болезнь Лайма, хроническая обструктивная болезнь легких, синдром Черджа-Стросса, рубцовый пемфигоид, целиакия, синдром Когана, синдром холодовой агглютинации, недостаточность по компоненту комплемента 2, черепной артериит, CREST синдром, болезнь Крона (одно из двух типов идиопатических воспалительных заболеваний кишечника "IBD"), синдром Кушинга, кожный лейкоцитокластический ангиит, болезнь Дего, болезнь Деркума, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, сахарный диабет 1 типа, диффузный кожный системный склероз, синдром Дресслера, дискоидная красная волчанка, экзема, эндометриоз, энтезит-опосредованный артрит, эозинофильный фасцит, приобретенный буллезный эпидермолиз, эритема, криоглобулинемия смешанного типа, синдром Эвана, прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия, фибромиалгия, фибромиозит, фиброзный альвеолит, гастрит, пемфигоид желудочно-кишечного тракта, гигантоклеточный артериит, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре (СГБ), энцефалит Хашимото, тиреоидит Хашимото, гемолитическая анемия, пурпура Геноха-Шенлейна, герпес беременных, гнойный гидраденит, синдром Хьюза, гипогаммаглобулинемия, идиопатические воспалительные демиелинизирующие заболевания, идиопатический легочный фиброз, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, IgA-нефропатии, миозит телец включения, воспалительная демиелинизирующая полиневропатия, промежуточный цистит, синдром раздраженного кишечника (СРК), ювенильный идиопатический артрит, ювенильный ревматоидный артрит, болезнь Кавасаки, миастенический синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, красный плоский лишай, склероатрофический лишай, болезнь линейного IgA, болезнь Лу Герига, волчаночный гепатит, красная волчанка, синдром Меджида, болезнь Меньера, микроскопический полиангиит, синдром Миллера-Фишера, смешанные заболевания соединительной ткани, кольцевидная склеродермия, болезнь Муха-Габерманна, синдром Макла-Уэльса, множественная миелома, рассеянный склероз, миастения, миозит, нарколепсия, нейромиелит зрительного нерва, нейромиотония, глазной рубцовый пемфигоид, опсоклонус миоклонус синдром, тиреоидит Орда, палиндромный ревматизм, PANDAS (детские аутоиммунные психоневрологические расстройства, ассоциированные со стрептококком), паранеопластическая дегенерация мозжечка, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), синдром Парри-Ромберга, синдром Персонейджа-Тернера, парспланит, пузырчатка, пузырчатка обыкновенная, пагубная анемия, перивенозный энцефаломиелит, POEMS синдром, узелковый полиартрит, ревматическая полимиалгия, полимиозит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, прогрессивная воспалительная невропатия, псориаз, псориатический артрит, гангренозная пиодермия, истинная эритроцитарная аплазия, энцефалит Расмуссена, феномен Рейно, рецидивирующий полихондрит, синдром Рейтера, синдром беспокойных ног, забрюшинный фиброз, ревматоидный артрит, ревматоидная лихорадка, саркоидоз, шизофрения, синдром Шмидта, синдром Шнитцлера, склерит, склеродермия, синдром Шегрена, спондилоартропатия, синдром липкой крови, болезнь Стилла, синдром мышечной скованности, подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром Сусака, синдром Свита, хорея Сиденгама, симпатическая офтальмия, синдром Такаясу, темпоральный артериит, синдром Толоса-Ханта, поперечный миелит, язвенный колит, недифференцированное заболевание соединительной ткани, недифференцированная спондилоартропатия, васкулит, витилиго, гранулематоз Вегенера, синдром Вильсона и Олдрича.

Дозирование и режимы дозировки анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антител.

В одном аспекте, способы лечения согласно изобретению обеспечивают введение пациенту композиции, включающей анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антитела, в терапевтически эффективных количествах. Терапевтически эффективное количество может представлять собой дозу от около 0,0003 до около 3 мг(антител)/кг(массы пациента) (например, от около 0,003 до около 3 мг/кг или от около 0,015 до около 3 мг/кг, например, от около 0,075 до около 3 мг/кг, от около 0,3 кг до около 3 мг/кг и от около 1 до около 3 мг/кг или любой вариант из около 0,0003 мг/кг, около 0,003 мг/кг, около 0,015 мг/кг, около 0,075 мг/кг, около 0,3 мг/кг, около 1 мг/кг и около 3 мг/кг). Дозировки и препараты анти-KIR антител описаны в WO 2008/084106, включенной в данный документ посредством ссылки. В одном варианте способ включает повторение введения по меньшей мере однажды, например, с частотой дозировки, варьирующей от 3 раз в день до одного раза в 2 месяца. Дозу можно также вводить, например, по меньшей мере, 3 раза, по меньшей мере, 6 раз или по меньшей мере 10 раз. В одном варианте антитела вводят внутривенно. В другом варианте связывание антител с ингибиторными KIR на поверхности NK-клеток потенцирует цитотоксическую активность NK-клеток. В другом варианте антитела являются кросс-реактивными анти-KIR антителами. Например, антитела могут представлять собой антитело 1-7F9 в композиции, как описано в WO 2008/084106.

В одном предпочтительном варианте дозу выбирают для обеспечения полного насыщения (по меньшей мере, 90% связывание анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител с мишенями) у человека. Этот способ может включать оценку пациента для потенцирования NK-клеток и/или противовоспалительной (или анти-Т-клеточной) активности (для чего может использоваться любая подходящая методика из применяемых в данной области, включая, например, уровень связывания анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител, CD107a в качестве маркера, как описано в данном документе). Препарат обычно вводят внутривенно в течение подходящего времени, например 1 ч.

Например, анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела могут быть введены в количестве и с частотой введения, достигающей по меньшей мере 90%, а предпочтительно 95% связывания KIR2DL1, 2 и/или 3 с NK-клетками в плазме в течение по меньшей мере одного, двух, трех или шести месяцев, тем самым обеспечивая устойчивое насыщение в течение длительного времени (например, по меньшей мере, 3 месяца, 6 месяцев). В отдельных вариантах доза варьирует от около 0,1 до около 3 мг/кг, от около 0,1 до около 1 мг/кг и от около 1 до около 3 мг/кг, кроме того, предпочтительно, чтобы антитело представляло собой анти-KIR антитело, кроме того, предпочтительно, чтобы антитело представляло собой 1-7F9. Частота дозировки может варьировать от одного раза в день до одного раза в два месяца, от одного раза в неделю до около одного раза в два месяца или около одного раза в месяц. Альтернативно, частота дозировки может быть выбрана от около трех раз, около двух раз, около одного раза в день; около пяти раз, около четырех раз, около трех раз и около двух раз в неделю и около одного раза каждые две, четыре и шесть недель.

В одном предпочтительном варианте дозу анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител для обеспечения полного насыщения рецепторов (например, по меньшей мере 90 или 95% связывания рецепторов) вводят от примерно двух раз в неделю до примерно одного раза в месяц или от примерно одного раза в месяц до примерно одного раза в два месяца. Доза может быть, например, введена по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере, 6 раз или более. Например, способ может включать введение анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител в количестве и с частотой дозировки, достигающей по меньшей мере около 90 или 95% насыщения KIR2DL1, 2 и/или 3 на NK-клетках в течение по меньшей мере двух недель, одного месяца, 6 месяцев 9 месяцев или 12 месяцев.

В одном предпочтительном варианте протокол приводит к обеспечению устойчивого, почти полного насыщения рецепторов. Вводят дозу анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител, обеспечивающую устойчивое, почти полное насыщение рецепторов в течение по меньшей мере 1 недели, 2 недель или 1 месяца. Когда доза обеспечивает устойчивое полное насыщение рецепторов (например, по меньшей мере 90 или 95% связывание рецепторов) в течение около одной недели, доза может быть введена, например, от одного раза в неделю до одного раза в каждые две недели; когда доза обеспечивает устойчивое полное насыщение рецепторов в течение около двух недель, дозу можно вводить от, например, одного раза каждые две недели до одного раза в месяц. При использовании любого протокола дозу можно, например, вводить по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере, 6 раз или более. Например, способ может включать введение анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител в количестве и с частотой дозировки, достигающей по меньшей мере примерно 95% связывания KIR на NK-клетках в течение по меньшей мере примерно 6 месяцев, 9 месяцев ил 12 месяцев.

В другом предпочтительном варианте протокол приводит к прерывающемуся практически полному насыщению рецепторов. Вводят дозу анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител, обеспечивающая прерывающееся практически полное насыщение рецепторов (например, по меньшей мере около 90 или 95% связывание рецепторов) в течение по меньшей мере около 1 недели, 2 недель, 1 месяца. Если доза обеспечивает практически полное насыщение рецепторов в течение примерно от одной до двух недель, дозу можно вводить, например, около одного раза в месяц или одного раза в течение по меньшей мере двух месяцев (например, один раз каждые два месяца). Если доза обеспечивает практически полное насыщение рецеп-

торов в течение примерно от двух недель до одного месяца, то дозу можно вводить, например, около одного раза в течение по меньшей мере двух месяцев (например, один раз каждые два месяца). В отдельных вариантах дозировка варьирует от примерно 0,1 до примерно 0,3 мг/кг, введение проводят примерно раз в месяц; в одном варианте дозировка варьирует от примерно 0,1 до примерно 3 мг/кг, предпочтительно от 1 до примерно 3 мг/кг, введение проводят примерно раз каждые два месяца (или один раз в промежуток времени более двух месяцев, т.е. менее одного раза в два месяца), более предпочтительно антитело представляет собой анти-KIR антитело, более предпочтительно антитело представляет собой 1-7F9. Лечение может быть повторено, чтобы протокол приводил к прерывающемуся практически полному насыщению рецепторов в течение по меньшей мере 6 месяцев, 9 месяцев или 12 месяцев.

Антитела обычно вводят внутривенно, но известны и другие возможные способы введения, которые также описаны, например, в WO 2008/084106.

В то время как анти-KIR (1-7F9) или его S241 вариант являются предпочтительными антителами для модулирования NK-клеточной активности и/или лечения заболевания, другие анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела могут также быть использованы в методиках согласно данному изобретению. Такие антитела должны, тем не менее, иметь сходное значение K_d, сходный клиренс в организме пациента и сходный объем распределения, как анти-KIR (1-7F9), где слово "сходный" обозначает около 50% соответствия параметрам анти-KIR (1-7F9), предпочтительно, в пределах 30% отклонения от параметров анти-KIR (1-7F9). Анти-KIR (1-7F9) обладает высокоаффинной K_d около 4 нг/мл и низкоаффинной K_d около 20 нг/мл для доз более 0,015 мг/кг; клиренс около 0,5 мл/ч/кг и объем распределения около 115 мл/кг (см. WO 2008/084106). Приведенные в примере анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антитела, используемые в одном или более методах изобретения, обладают следующими свойствами: а) уменьшают или блокируют ингибирующую сигнализацию KIR2DL1, 2 и/или 3 на NK-клетках; б) высокоаффинная K_d от около 2 до около 6 нг/мл; в) низкоаффинная K_d от около 10 до около 30 нг/мл; г) клиренс от около 0,25 до около 0,75 мл/ч/кг; д) объем распределения от около 50 до около 175 мл/кг. Связывание рецепторов анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителами может быть определено при помощи анализов, как описано в настоящем изобретении, адаптированном для конкретных KIR2DL1, 2 и/или 3, связанных с антителами. См., например, Пример 2. Фармакологические свойства анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител могут быть определены при помощи анализов, описанных в настоящем изобретении, адаптированных к конкретным анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антителам. См., например, Пример 1.

Аутоиммунные заболевания.

И анти-KIR2DL1, и KIR2DL2, и KIR2DL3 антитела, описанные здесь, могут быть использованы в композициях, применениях и способах лечения аутоиммунных заболеваний.

Примеры аутоиммунных заболеваний или расстройств включают такие расстройства, как синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), приобретенная атрофия поджелудочной железы, острый передний увеит, острый рассеянный энцефаломиелит, острый подагрический артрит, острый геморрагический некротический лейкоэнцефалит, острый или хронический синусит, острый гнойный менингит (или другие воспалительные заболевания центральной нервной системы), острое тяжелое воспаление, болезнь Аддисона, адреналит, сахарный диабет, развивающийся у взрослых (диабет II типа), идиопатический гипопаратиреоз, развивающийся у взрослых (AOIH), агаммаглобулинемия, агранулоцитоз, васкулиты (включая васкулит больших сосудов (в том числе ревматическая полимиалгия и артрит гигантских клеток (артрит Такаясу)), аллергические состояния, аллергический контактный дерматит, аллергический дерматит, аллергический гранулематозный васкулит, аллергическая гиперчувствительность, аллергический неврит, аллергические реакции, гнездная алопеция, тотальная алопеция, синдром Альпорта, альвеолит (например, аллергический альвеолит и фиброзирующий альвеолит), болезнь Альцгеймера, амилоидоз, амилотрофический боковой склероз (АБС, болезнь Лу Геринга), расстройства, связанные с эозинофилами (например, эозинофилия), анафилаксия, болезнь Бехтерева, ангиэктазия, антитело-опосредованный нефрит, анти-GBM/анти-TBM нефрит, комплекс антиген-антитело-опосредованные заболевания, синдром Гудпасчера, синдром антифосфолипидных антител, антифосфолипидный синдром (АФС), афты, афтозный стоматит, апластическая анемия, аритмия, атеросклероз, атеросклеротические расстройства, артрит (например, ревматоидный артрит, такой как острый артрит, хронический ревматоидный артрит), хронический прогрессирующий артрит, деформирующий артрит, аскаридоз, аспергиллома (или гранулемы, содержащие эозинофилы), аспергиллез, аспермиогенез, астма (например, бронхиальная астма, а также аутоиммунная астма), атаксия-телеангиэктазия, атаксический склероз, атеросклероз, аутизм, аутоиммунные ангионевротический отек, аутоиммунная апластическая анемия, аутоиммунный атрофическийо гастрит, аутоиммунный диабет, аутоиммунное заболевание яичек и яичников, включая аутоиммунный орхит и оофорит, аутоиммунные расстройства синтеза коллагена, аутоиммунная вегетативная дистония, аутоиммунные заболевания уха (например, аутоиммунные заболевания внутреннего уха (AGED)), аутоиммунные эндокринные заболевания, включая тиреоидит, такой как аутоиммунный тиреоидит, аутоиммунная энтеропатия, аутоиммунная дисфункция половых желез, аутоиммунная потеря слуха, аутоиммунный гемолиз, аутоиммунный гепатит, аутоиммунные гепатологические расстройства, аутоиммунная гиперлипидемия, аутоиммунный иммунодефицит, аутоиммунные заболевания внутреннего уха (AIED), аутоиммунный миокардит, аутоиммунная нейтропения, аутоиммунный панкреатит, ауто-

иммунная полиэндокринопатия, аутоиммунный полигландулярный синдром I типа, аутоиммунная ретинопатия, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура (АТП), аутоиммунные заболевания щитовидной железы, аутоиммунная крапивница, аутоиммунно-опосредованные заболевания желудочно-кишечного тракта, аксональные и нейрональные невропатии, болезнь Бало, болезнь Бехчета, семейное доброкачественное, ишемически-реперфузионное повреждение, доброкачественный лимфоцитарный васкулит, болезнь Бергера (IgA нефропатия), экзогенный аллергический альвеолит, слепота, болезнь Бека, облитерирующий бронхиолит (без пересадки) при NSIP (неспецифическая интерстициальная пневмония), бронхит, бронхо-пневматический аспергиллез, синдром Брутона, буллезный пемфигоид, синдром Каплана, кардиомиопатия, сердечно-сосудистая ишемия, синдром Кастельмана, глютеновая болезнь, целиакия, спру целиакия (глютеновая энтеропатия), дегенерация мозжечка, церебральная ишемия, заболевания, сопровождающиеся васкуляризацией, болезнь Шагаса, каналопатии (например, эпилепсия), каналопатии ЦНС, хориоретинит, хориоидит, аутоиммунные гематологические расстройства, хронический активный гепатит и аутоиммунный хронический активный гепатит, хронический контактный дерматит, хроническая эозинофильная пневмония, синдром хронической усталости, хронический гепатит, хронический аллергический пневмонит, хронический воспалительный артрит, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), хроническое стойкое воспаление, хронический кожно-слизистый кандидоз, хронические невропатии (например, IgM-полиневропатия или IgM-опосредованная невропатия), хроническая обструктивная болезнь легких, хроническое воспаление легких, хронический рецидивирующий мультифокальный остомиелит (CRMO), хронический тиреоидит (тиреоидит Хашимото) или подострый тиреоидит, синдром Черджа-Стросса, рубцовый пемфигоид доброкачественный пемфигоид слизистой оболочки, воспалительные заболевания центральной нервной системы, васкулит ЦНС, целиакия, синдром Когана, синдром холодовой агглютинации, полипозный колит, колиты, такие как язвенный колит, коллагеновый колит, сопровождающийся инфильтрацией Т-клеток и хронические воспалительные реакции, врожденный порок сердца, врожденная краснуха, анемия с положительной пробой Кумбса, заболевания коронарных артерий, миокардит Коксаки, CREST синдром (кальциноз, синдром Рейно), болезнь Крона, криоглобулинемия, синдром Кушинга, циклит (например, хронический циклит, гетерохронный циклит, иридоциклит или циклит Фукса), муковисцидоз, цитокин-индуцированная токсичность, глухота, дегенеративный артрит, демиелинизирующие заболевания (например, аутоиммунные демиелинизирующие заболевания), демиелинизирующие невропатии, лихорадка денге, герпетиформный дерматит и атопический дерматит, в том числе контактный дерматит, дерматомиозит, дерматозы с острым воспалением, болезнь Девика (нейромиелит зрительного нерва), расстройства крупных артерий, вызванные диабетом, диабетическая нефропатия, диабетическая ретинопатия, синдром Даймонда-Блэкфена, диффузный интерстициальный легочный фиброз, дилатационная кардиомиопатия, дискоидная красная волчанка, заболевания, сопровождаемые диапедезом лейкоцитов, синдром Дресслера, контрактуры Дюпюитрена, инфекции эховирусом, экзема, в том числе сопровождаемая аллергическим или атопическим дерматитом, энцефалит, такой как энцефалит Расмуссена и энцефалит лимбической системы и/или ствола мозга, энцефаломиелит (например, аллергический энцефаломиелит или экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ)), внутриартериальная гиперплазия, эндокардит, эндокринная офтальмопатия, эндометриоз, эндомиокардиальный фиброз, факоанафилактический эндофтальмит, эндофтальмит, энтерит, аллергический синдром эозинофилии-миалгии, эозинофильный фасциит, эпидемический кератоконъюнктивит, приобретенный буллезный эпидермолиз (ПБЭ), эписклера, эписклеритом, вирусная инфекция Эпштейна-Барра, стойкая возвышающаяся эритема, мультиформная эритема, узловатая лепрозная эритема, узловатая эритема, эритробластоз пищевода зародыша, нарушения эзофагеальной моторики, криоглобулинемия смешанного типа, этмоидит, синдром Эванса, экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ), дефицит фактора VIII, "легкое фермера" или экзогенный аллергический альвелиолит, ревматическая лихорадка, синдром Фелти, фибромиалгия, фиброзирующий альвеолит, флариаз, фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), пищевые отравления, атрофия желудка, гигантоклеточный артериит (темпоральный артериит), гигантоклеточный гепатит, гигантоклеточная полимиалгия, гломерулонефритиды, гломерулонефрит (ГН) с и без нефротического синдрома, такой как хронический или острый гломерулонефрит (например, первичный ГН), синдром Гудпасчера, подагрический артрит, синдромы, связанные с переливанием гранулоцитов, гранулематоз, включая лимфоматоидный гранулематоз, гранулематоз с полиангиитом (GPA), гранулематозный увеит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, каплевидный псориаз, пароксизмальная гемоглобинурия, болезнь Хаммена-Рича, болезнь Хашимото, энцефалит Хашимото, тиреоидит Хашимото, гемохроматоз, гемолитическая анемия или иммунная гемолитическая анемия, в том числе аутоиммунная гемолитическая анемии (AIHA), гемолитическая анемия, гемофилия, пурпура Шенлейна-Геноха, герпес беременных, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), гипералгезии, гипогаммаглобулинемия, гипогонадизм, гипопаратиреоз, идиопатический несахарный диабет, идиопатический паралич лицевого нерва, идиопатический гипотиреоз, идиопатическая IgA нефропатия, идиопатический мембранный ГН или идиопатическая мембранная нефропатия, идиопатический нефротический синдром, идиопатический легочный фиброз, идиопатическая спру, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP) IgA нефропатия, IgE-опосредованные заболевания (например, анафилаксии, аллергический и атопический ринит), IgG4-связанные склеротические заболе-

вания, регионарный илеит, иммунокомплексный нефрит, иммунные ответы, связанные с острой и отсроченной гиперчувствительностью, опосредованные цитокинами и Т-лимфоцитами, иммунный ГН, иммунорегуляторные липопротеины, в том числе острый респираторный дистресс-синдром или респираторный дистресс-синдром взрослых (ARDS), миозит с тельцами включения, инфекционный артрит, бесплодие из-за анти-сперматозоидных антител, воспаление всего или части увеального тракта, воспалительные заболевания кишечника (IBD), воспалительные гиперпролиферативные заболевания кожи, воспалительная миопатия, инсулин-зависимый сахарный диабет (I типа), инсулит, интерстициальный цистит, интерстициальное заболевание легких, интерстициальный фиброз легких, ирит, ишемическое реперфузионное повреждение, воспаление суставов, ювенильный артрит, юношеский дерматомиозит, ювенильный диабет, юношеский сахарный диабет (I типа), включая инсулин-зависимый сахарный диабет у детей (IDDM), ювенильный ревматоидный артрит, синдром Кавасаки, сухой кератоконъюнктивит, трипаносомоз, синдром Ламберта-Итона, лейшманиоз, проказа, лейкопения, недостаточность адгезии лейкоцитов, лейкоцитокластический васкулит, лейкопения, красный плоский лишай, склероатрофический лишай, кератоконъюнктивит, линейный IgA дерматоз, линейные IgA заболевания (LAD), синдром Леффлера, волчаночный гепатит, волчанка (в том числе нефрит, энцефалит, педиатрическая, непочечная, внепочечная, дискоидная, алопеция), волчанка (СКВ), диссеминированная красная волчанка, артрит Лайма, болезнь Лайма, лимфоидная интерстициальная пневмония, малярия, мужское и женское аутоиммунное бесплодие, васкулит верхнечелюстной артерии, васкулит средних сосудов (в том числе болезнь Кавасаки и узелковый полиартрит), мембранный или мембранный пролиферативный ГН (MPGN), в том числе I типа и II типа, быстро прогрессирующий ГН, мембранный ГН (мембранные нефропатии), болезнь Меньера, менингит, микроскопический колит, микроскопический полиангиит, мигрень, нефропатия с минимальными изменениями, смешанные заболевания соединительной ткани (MCTD), инфекционный мононуклеоз, язва Морена, болезнь Муха-Габермана, мультифокальная моторная нейропатия, эндокринная множественная недостаточность, синдром множественного повреждения органов вследствие сепсиса, травмы или кровотечения, синдром множественного повреждения органов, рассеянный склероз (РС), такой, как спинно-оптический РС, эпидемический паротит, мышечные нарушения, миастения гравис, например, ассоциированная с тимомой миастения гравис, миокардит, миозит, нарколепсия, некротизирующий энтероколит и трансмуральный колит, аутоиммунные воспалительные заболевания кишечника, некротизирующий, кожный или аллергический васкулит, неонатальный волчаночный синдром (НВС), нефроз, нефротический синдром, неврологические заболевания, нейромиелит зрительного нерва (Девика), нейромиелит зрительного нерва, нейромиотония, нейтропения, доброкачественный лимфоцитоз, негранулематозный увеит, доброкачественные тимомы, глазные и орбитальные воспалительные заболевания, глазной рубцовый пемфигоид, оофорит, симпатическая офтальмия, опсоклонус миоклонус синдром (OMS) опсоклонус или опсоклонус миоклонус синдром (OMS), и сенсорная невропатия, неврит зрительного нерва, гранулематозный орхит, остеоартроз, палиндромный ревматизм, панкреатит, панцитопения, PANDAS (детское аутоиммунное психоневрологическое расстройство, ассоциированное со стрептококком), паранеопластическая дегенерация мозжечка, паранеопластический синдром, паранеопластические синдромы, в том числе неврологические паранеопластические синдромы (например, миастенический синдром Ламберта-Итона или синдром Ламберта-Итона), паразитарные заболевания, такие как лейшманиоз, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), синдром Парри-Ромберга, парспланит (периферический увеит), синдрома Персоннейджа-Тернера, парвовирусные инфекции, пемфигоид, такой как буллезный и кожный пемфигоид, пузырчатка (в том числе обыкновенная пузырчатка), волчанковая пузырчатка, листовидная пузырчатка, пемфигоид слизистых, пузырчатка, язвенная болезнь, периодический паралич, периферическая невропатия, перивенозной энцефаломиелит, злокачественная анемия (пернициозная анемия), злокачественная анемия, факоантигенный увеит, цирроз легкого, синдром Кроу-Фуказа (POEMS), узелковый полиартрит, первичный хронический полиартрит I, II и III типа, полихондрит (например, устойчивый или рецидивирующий полихондрит), полиэндокринное аутоиммунное заболевание, полиэндокринная недостаточность, полигландулярный синдром (например, аутоиммунный полигландулярный синдром (или полигландулярный эндокринопатический синдром)), ревматическая полимиалгия, полимиозит, полимиозит/дерматомиозит, полинейропатия, острый полирадикулоневрит, посткардиотомный синдром, задний увеит или аутоиммунный увеит, постинфарктный синдром, посткардиотомный синдром, постстрептококковый нефрит, поствакцинальный синдром, пресенильное слабоумие, первичный билиарный цирроз, первичный гипотиреоз, первичная идиопатическая микседема, первичный лимфоцитоз, включающий моноклональный В-клеточный лимфоцитоз (например, доброкачественную моноклональную гаммапатию и моноклональную гаммапатию неопределенного генеза, MGUS), первичная микседема, первичный прогрессирующий РС (PPMS) и возвратно-ремиттирующий РС (RRMS), первичный склерозирующий холангит, прогестероновый дерматит, прогрессирующий системный склероз, пролиферативный артрит, псориаз, такой как пятнистый псориаз, псориаз, псориатический артрит, легочно-альвеолярный протеиноз, эозинофильный инфильтрат легкого, истинная эритроцитарная анемия или аплазия (PRCA), гнойный или безгнойный синусит, пустулезный псориаз и псориаз ногтей, пиелит, гангренозная пиодермия, тиреоидит Кервена, феномен Рейно, реактивный артрит, привычный выкидыш, снижение артериального давления, рефлекторная симпатическая дистрофия, устойчивое спру, болезнь

или синдром Рейтера, рецидивирующий полихондрит, реперфузионное повреждение миокарда или других тканей, реперфузия травмы, респираторный дистресс-синдром, синдром беспокойных ног, аутоиммунные заболевания сетчатки, забрюшинный фиброз, синдром Рейно, ревматические заболевания, ревматизм, ревматическая лихорадка, ревматоидный артрит, ревматоидный спондилит, инфекция вирусом краснухи, синдром Сэмптера, саркоидоз, шистосомоз, синдром Шмидта, SCID и связанные с вирусом Эпштейн-Барра заболевания, заболевания склеры, склерит, склеродактилия, склеродермия (включая системную склеродермию), склерозирующий холангит, диссеминированный склероз, склероз, такой как системный склероз, сенсоневральная потеря слуха, серонегативные спондилоартриты, синдром Шихана, синдром Шульмана, силикоз, синдром Шегрена, аутоиммунность к сперме и яичкам, клиновидной синусит, синдром Стивенса-Джонсона, синдром мышечной скованности, подострый бактериальный эндокардит (SBE), подострая кожная красная волчанка, внезапная потеря слуха, синдром Сусака, хорея Сиденхема, симпатическая офтальмия, системная красная волчанка (СКВ) или системная эритематозная волчанка (например, кожная СЭВ), системный некротический васкулит и ANCA-ассоциированный васкулит, такой как васкулит или синдром Черджа-Стросса (CSS), сухотка спинного мозга, артериит Такаясу, телеангиэктазия, височный артериит/гигантоклеточный артериит, облитерирующий тромбангиит, тромбоцитопения (например, развивающаяся у больных инфарктом миокарда), в том числе тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP) и аутоиммунная или иммунная тромбоцитопения, такая как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP), включая хроническую или острую ITP, тромбоцитопеническая пурпура (TP), тиреотоксикоз, повреждение тканей, синдром Толоса-Ханта, токсический эпидермальный некролиз, синдром токсического шока, реакции на переливание, транзиторная гипогаммаглобулинемия новорождённых, поперечный миелит, поперечный миелит, тропическая легочная эозинофилия, туберкулез, язвенный колит, недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), крапивница (например, хроническая аллергическая крапивница и хроническая идиопатическая крапивница, в том числе хроническая аутоиммунная крапивница), увеит (например, передний увеит), увеоретинит, вальвулит, сосудистая дисфункция, васкулит, позвоночный артрит, везикуло-буллезный дерматоз, витилиго, гранулематоз Вегенера (в настоящее время известен как гранулематоз с полиангиитом (GPA), синдром Вискотта-Олдрича и сцепленный с X-хромосомой гипер IgM синдром, но не ограничиваются ими.

Лечение раковых заболеваний.

Анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела, описанные здесь, могут быть использованы в композициях, применениях и способах лечения раковых заболеваний (например, опухолей).

Примерами раковых заболеваний являются карцинома, лимфома, бластома, саркома и лейкоз. Более конкретными примерами таких раковых заболеваний являются плоскоклеточный рак, рак легких (в том числе мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарцинома легких и плоскоклеточный рак легких), рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка (включая рак желудочно-кишечного тракта), рак поджелудочной железы, глиобластома, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, карцинома эндометрия или матки, карцинома слюнных желез, почечный или почечно-клеточный рак, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карцинома печени и различные виды рака головы и шеи, а также В-клеточная лимфома (включая фолликулярную неходжкинскую лимфому (НХЛ) низкой степени злокачественности; мелкоклеточную лимфоцитарную (МЛ) НХЛ; фолликулярную НХЛ средней степени злокачественности; диффузную НХЛ средней степени злокачественности; иммунобластную НХЛ высокой степени злокачественности; лимфобластную НХЛ высокой степени злокачественности; мелкоклеточную НХЛ с нерасщепленным ядром высокой степени злокачественности; НХЛ с массивным поражением; лимфому из клеток мантийной зоны; СПИД-опосредованную лимфому и макроглобулинемию Вальденстрема); хронический лимфолейкоз (ХЛЛ); острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); волосатоклеточный лейкоз, хронический миелобластный лейкоз; множественная миелома и посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство (PLTD).

Список раковых заболеваний, поддающихся лечению с помощью настоящего изобретения, включает карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретными примерами таких раковых заболеваний являются плоскоклеточный рак, рак легких (в том числе мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарцинома легких и плоскоклеточный рак легких), рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка (включая рак желудочно-кишечного тракта), рак поджелудочной железы, глиобластома, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, карцинома эндометрия или матки, карцинома слюнных желез, почечный или почечно-клеточный рак, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карцинома печени и различные виды рака головы и шеи, а также В-клеточная лимфома (включая фолликулярную неходжкинскую лимфому (НХЛ) низкой степени злокачественности; мелкоклеточную лимфоцитарную (МЛ) НХЛ; фолликулярную НХЛ средней степени злокачественности; диффузную НХЛ средней степени злокачественности; иммунобластную НХЛ высокой степени злокачественности; лимфобластную НХЛ высокой степени злокачественности; мелкоклеточную НХЛ с нерасщепленным ядром высокой степени злокачественности; НХЛ с массивным поражением; лимфому из клеток мантийной зоны; СПИД-опосредованную лимфому и

макроглобулинемию Вальденстрема); хронический лимфолейкоз (ХЛЛ); острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); волосатоклеточный лейкоз, хронический миелобластный лейкоз; множественная миелома и посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство (PLTD), а также аномальная пролиферация сосудов, связанная с факоматозами, отеки (как, например, связанные с опухолями головного мозга) и синдром Мейгса. Предпочтительно рак выбирают из группы, включающей рак молочной железы, колоректальный рак, рак прямой кишки, немелкоклеточный рак легких, неходжкинскую лимфому (НХЛ), гепатоцеллюлярный рак, рак предстательной железы, рак печени, рак поджелудочной железы, саркому мягких тканей, саркому Капоши, карциноидную карциному, рак головы и шеи, меланому, рак яичников, мезотелиому и множественную миелому. В примере варианта воплощения изобретения (см. Примеры) рак мочевого пузыря, яичников или меланома находится на ранней стадии (в том числе метастатической). В другом варианте рак представляет собой рак толстой кишки. Раковые состояния, поддающиеся лечению настоящим изобретением, включают метастатические раковые заболевания, где экспрессия KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 супрессорными клетками, являющимися производными миелоидных клеток, подавляет противоопухолевые реакции и анти-инвазивные иммунные реакции. Способ с использованием настоящего изобретения особенно подходит для лечения васкуляризированных опухолей.

Изобретение также может использоваться для лечения раковых заболеваний в сочетании с химиотерапией или радиотерапией или другими медицинскими техниками для увеличения их активности, например, у больных, у которых экспрессия KIR2DL1, KIR2DL2, и KIR2DL3 супрессорными клетками, являющимися производными миелоидных клеток, подавляет антиопухолевый ответ и ослабляет эффективность химиотерапии и радиотерапии. Любой химиотерапевтический агент, обладающий противораковой активностью, может быть использован в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно химиотерапевтический агент может быть выбран из группы, включающей алкилирующие агенты, антиметаболиты, аналоги фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и родственные ингибиторы, алкалоиды барвинка, эпиподофилотоксины, антибиотики, L-аспарагиназу, ингибиторы топоизомераз, интерфероны, комплексные соли платины, антрацендионы, производные мочевины, производные метилгидразина, супрессоры надпочечников, адренокортикостероиды, прогестины, эстрогены, антиэстроген, андрогены, антиандрогены и аналоги гонадотропин-высвобождающего гормона. Более предпочтительно, если химиотерапевтический агент будет выбран из группы, включающей 5-фторурацил (5-FU), лейковорин (ЛВ), иринотекан, оксалиплатин, капецитабин, паклитаксел и доксетацел. Два или более химиотерапевтических агента могут использоваться в смеси и вводиться в сочетании с анти-VEGF антителами. Одна предпочтительная комбинированная химиотерапия является основанной на применении фторурацила, включающей в себя 5-FU и один или более других химиотерапевтических агентов. Применимые режимы дозировки при комбинированной химиотерапии известны в медицине и описаны, например, в Saltz, et al. (1999), Proc. ASCO 18:233a и Douillard, et al. (2000), Lancet, 355:1041-7. Биомедицинские препараты могут быть еще одним средством активации иммунной системы, например, антитела против PD-L1, PD-L2, CTLA-4, белки слияния с PD-L1, PD-L2, CTLA-4, а также цитокины, антагонисты и агонисты факторов роста, гормоны и антитела против цитокинов.

Аллергические заболевания.

Анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела, описанные здесь, могут использоваться в композициях, применениях и способах лечения аллергических заболеваний (например, аллергических реакций на аллергены).

Примерами аллергенов могут служить клещевой аллерген и пыльцевой аллерген.

Примеры аллергических заболеваний включают бронхиальную астму, аллергический ринит, атопический дерматит и аллергию на пыльцу и насекомых. Аллергический диатез представляет собой генетический фактор, который может быть унаследован детьми от страдающих аллергией родителей. Семейные аллергические заболевания называются также атопическими заболеваниями, и причинным генетически передающимся фактором является атопический диатез. "Атопический дерматит" - это общий термин, обозначающий атопическое заболевание, особенно заболевание, сопровождаемое симптомами дерматита. Предпочтительные примеры включают аллергические состояния, выбранные из группы, включающей экзему, аллергический ринит, сенную лихорадку, симптомы крапивницы и пищевую аллергию. Аллергические состояния включают экзему, аллергический ринит или воспаление слизистых оболочек, сенную лихорадку, бронхиальную астму, крапивницу (сыпь) и пищевую аллергию или другие атопические состояния.

Воспалительные состояния и воспалительные заболевания.

Анти-KIR2DL 1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела, описанные здесь, могут использоваться в композициях, применениях и способах лечения воспалительных состояний и воспалительных заболеваний.

Воспалительные состояния и воспалительные заболевания включают ревматические заболевания (например, ревматоидный артрит, остеоартрит, псориатический артрит), спондилоартропатии (например, анкилозирующий спондилит, реактивный артрит, синдром Рейтера), кристаллические артропатии (например, подагра, псевдоподагра, расстройство осаждения пирофосфата кальция), рассеянный склероз, болезнь Лайма, ревматическую полимиалгию, заболевания соединительных тканей (например, системная красная волчанка, системный склероз, полиомиозит, дерматомиозит, синдром Шегрена); васкулиты ((на-

пример, нодозный полиартериит, гранулематоз Вегенера, синдром Черга-Штраусса); воспалительные состояния, включая последствия травм или ишемии, саркоидоз; сосудистые заболевания, включая атеросклеротическую болезнь сосудов, атеросклероз и окклюзионные болезни сосудов (например, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, сердечный приступ, заболевания периферических сосудов) и рестеноз в стенте сосудов; заболевания глаз, включая увеит, заболевания роговицы, ирит, иридоциклит и катаракту.

Воспалительные состояния включают рефлюкс/изжогу, акне, юношеские угри, аллергию и гиперчувствительность, болезнь Альцгеймера, астму, атеросклероз и сосудистый облитерирующий эндартериит (например, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, инсульт, заболевания периферических сосудов) и рестеноз в стенте сосудов, аутоиммунные заболевания, бронхит, рак, кардит, катаракту, целиакию, хронические боли, хронический простатит, цирроз, колит, заболевания соединительной ткани (например, системная красная волчанка, системный склероз, полимиозит, дерматомиозит, синдром Шегрена), заболевания роговицы, болезнь Крона, кристаллические артропатии (например, подагра, псевдоподагра, расстройство осаждения пирофосфата кальция), деменция, дерматит, диабет, сухость глаз, экзема, эдема, эмфизема, фибромиалгия, гастроэнтерит, гингивит, гломерулонефрит, болезни сердца, гепатит, высокое кровяное давление, гиперчувствительность, воспалительные заболевания кишечника, воспалительные состояния, включая последствия травмы или ишемии, инсулинорезистентность, интерстициальный цистит, иридоциклит, ирит, боли в суставах/артрит/ревматоидный артрит, болезнь Лайма, метаболический синдром (синдром X), рассеянный склероз, миозит, нефрит, ожирение, заболевания глаз, в том числе увеит, остеопения, остеопороз, болезнь Паркинсона, воспалительные заболевания таза, пародонтоз, полиартериит, полихондрит, ревматическая полимиалгия, псориаз, реперфузионное повреждение, ревматический артрит, ревматические заболевания (например, ревматоидный артрит, остеоартрит, псориатический артрит), ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермия, синусит, синдром Шегрена, слизистый колит, спондилоартропатии (например, болезнь Бехтерева, реактивный артрит, синдром Рейтера), системный кандидоз, тендинит, отторжение трансплантата, инфекции мочевыводящих путей, вагинит, сосудистые заболевания, включая атеросклеротические сосудистые заболевания, васкулиты (например, узелковый полиартрит, гранулематоз Вегенера, синдром Черджа-Стросса) и васкулит.

Способы диагностики.

Анти-KIR2DL 1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и анти-KIR2DL 1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела, селективно связывающиеся с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть использованы для диагностики для детекции наличия или отсутствия полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Анти-KIR2DL 1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела могут быть использованы в способах, включающих а) контактирование тестируемого образца с антителами или их фрагментами, связывающими KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, и б) анализ на наличие комплексов антитело-эпитоп. Антитело-эпитоп комплексы можно детектировать с помощью Вестерн-блоттинга, радиоиммуноанализа, ИФА (твердофазного иммуноферментного анализа), иммуноферментного сэндвич-анализа, иммунопреципитации, реакции преципитации, реакции иммунодиффузии в геле, иммунодиффузии, реакции агглютинации, реакции фиксации комплемента, иммуногистохимического анализа, флуоресцентного иммуноанализа и иммуноанализа с белком А. Образец может представлять собой биопсию ткани, лимфу, мочу, спинномозговую жидкость, амниотическую жидкость, воспалительный экссудат, кровь, сыворотку, кал или жидкость, собранную из колоректального тракта.

Антитела, селективно связывающиеся с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут быть рекомбинантными. Фрагменты антител, селективно связывающиеся с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут представлять собой Fab, Fab', F(ab')2, Fv, CDR, паратопы или часть антитела, способную связывать антиген. Антитела, селективно связывающиеся с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут быть химерными, гуманизированными, анти-идиотипическими, одноцепочечными, бифункциональными или коспецифичными. Антитела, селективно связывающиеся с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут представлять собой фрагменты, конъюгированные с меткой, включая хемилюминесцентную метку, парамагнитную метку (например, алюминий, марганец, платина, кислород, лантан, лютеций, скандий, иттрий или галлий), контрастный агент для МРТ, флуоресцентную метку, биолюминесцентную метку или радиоактивную метку.

Дополнительно KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела, селективно связывающиеся с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть связаны с твердым носителем (например, с бусинами, пробирками, пластинками, культуральными чашками или тестовым полосками), как, например, на чипе.

Способ включает проявление изображения полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), CCD мониторинговой системы с низкой освещенностью, рентгеновских лучей, КТ, сцинтиграфии, фото-акустической томографии, однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ), магнитно-резонансной томографии (МРТ), УЗИ, парамагнитной томографии и эндоскопической оптической когерентной томографии.

Изобретение может включать стадию проведения оценки или тестирование на наличие, стадию,

прогресс и тяжесть заболевания. Таким образом, способ лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания у пациента может включать а) проведение оценки заболевания у пациента и, б) если оказывается, что заболевание пациента можно лечить анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антителами изобретения, введение пациенту эффективной дозы анти-KIR2DL1, 2 и/или 3 антител. Дополнительно такая оценочная стадия может включать получение биологического образца от пациента с подозрением на аутоиммунное или воспалительное заболевание. Например, KIR и HLA-C генотип пациента, страдающего ревматоидным артритом, может предоставить информацию для дальнейшего прогнозирования ответа на анти-ФНОα терапию. См. McGeough, et al. (2011) Rheumatology International. Кроме того, экспрессия изоформ KIR2DL ассоциирована с предрасположенностью к воспалительным заболеваниям кишечника. Zhang, et al. (2008), Life Science Journal, 5(4):17-22. Способы оценки заболеваний (например, постановка диагноза, стадии) могут осуществляться с применением любой подходящей техники, известной в медицине, например, с помощью постановки лабораторных тестов. Примерами подходящих техник являются постановка ПЦР или ПЦР в реальном времени (например, чтобы определить связанные с болезнью нуклеиновые кислоты или гены, известные также как "маркеры" или "биомаркеры"), биопсия, эндоскопия, анализ кала, любые неинвазивные лабораторные тесты (например, на анемию и инфекцию, тест на функционирование печени для определения проблем, связанных с печенью и желчными протоками, тест на бактериальные и вирусные инфекции, паразитарное заражение), ультразвук, КТ, магнитно-резонансная энтерография, МРТ и другие методы визуализации, хромосомный анализ, иммуноанализ/иммуноцитохимические методики обнаружения (например, наличия аутоантител), гистологические и/или гистопатологические анализы, электрофорез белков крови, проточная цитометрия (например, обнаружение иммунных клеток, Т-клеток), анализ газов артериальной крови (ABG) (при астме и ХОБЛ), а также физическое обследование (например, для физических симптомов, число суставов с синовитом).

Кроме того, субъекты с активированными KIR2DS1 и/или KIR2DS2 генами предрасположены к развитию псориатического артрита, но только, если HLA лиганды к их гомологичным ингибиторным рецепторам, KIR2DL1 и KIR2DL2/3, отсутствуют. Отсутствие лигандов для ингибиторных ICIR может в дальнейшем снизить порог для NK (и/или Т) клеточной активации, запускающейся активирующими рецепторами, тем самым способствуя патогенезу псориатического артрита. Martin, et al. (2002), The Journal of Immunology, 169:2818-2822. Способы включают определение присутствия ауто-антител, например, определение ревматоидного фактора (РФ), антител против циклических цитруллинированных пептидов, анти-оцРНК, анти-дцРНК, анти-Smith, антифосфолипидных, антиядерных и/или антиактиновых антител. В одном варианте способы включают оценку уровней протеолитического фермента, воспалительного медиатора, маркера воспаления или провоспалительного цитокина. В одном варианте способы включают определение уровня с-реактивного белка (СРБ) и/или скорости оседания эритроцитов. Определение того, что у пациента аномальные результаты (наличие заболевания, обострения, начинающегося воспаления), например аномальный уровень ABG, аутоантител, СРБ, какого-либо протеолитического фермента, воспалительного медиатора или маркера воспаления, означает, что пациент подходит для лечения анти-KIR2DL 1, 2 и/или 3 антителами. Биологический образец, полученный от пациента, оценивают на наличие Т-клеток, предпочтительно $CD4^+$ Т-клеток, и/или активированных, и/или пролиферирующих Т-клеток.

Скриннинг.

Изобретение обеспечивает способ определения модуляторов ("скрининг"), т.е. кандидатов или тестовых соединений или агентов (например, пептидов, пептидомиметиков, малых молекул или других препаратов), связывающихся с полипептидами KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, оказывающих стимулирующий или ингибирующий эффект, например, на экспрессию KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или активность KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, или оказывающих стимулирующий или ингибирующий эффект на взаимодействие KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 и их природных партнеров связывания.

Настоящее изобретение обеспечивает скрининг кандидатов или тестовых соединений, связывающихся с белками или полипептидами KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, или их биологически активными частями, которые, например, изменяют способность полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 взаимодействовать с их природными партнерами связывания. В другом варианте изобретение обеспечивает скрининг кандидатов или тестовых соединений, связывающихся или изменяющих активность белков или полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, или их биологически активных частей. В одном варианте изобретение обеспечивает скрининг кандидатов или тестовых соединений, оказывающих стимулирующий или ингибирующий эффект на иммунные функции, негативно регулируемые KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, как описано в настоящем документе, или на основании их влияния на взаимодействие KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 с их партнерами связывания. Данные связанные с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 функции включают, например, ингибирование продукции цитокинов (например, IL-2, интерферона гамма Т-клетками, подавление умеренной ко-стимуляции CD28, ингибирование пролиферации $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, подавление пролиферации наивных $CD4^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток памяти и подавление активации TCR без индукции апоптоза). Анализируемое соединение по настоящему изобретению может быть получено любым известным в уровне техники комбинаторным методом синтеза библиотек, включая биологические библиотеки; параллельные пространственно-организованные библиотеки

на твердой фазе или в растворимой фазе; методы синтеза библиотек с деконволюцией; библиотеки "одна микросфера - одно соединение" и методы синтеза библиотек с использованием отбора с помощью аффинной хроматографии. Подход с использованием биологических библиотек ограничен случаем пептидных библиотек, в то время как другие четыре подхода применимы к пептидным библиотекам, библиотекам непептидных олигомеров и малых молекул. Lam (1997), Anticancer Drug Des. 12:145.

В одном варианте анализ представляет собой основанный на клетках анализ, в котором клетку, экспрессирущую полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или их биологически активные части, вводят в контакт с тестовым соединением, которое изменяет активность KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Определение способности анализируемого соединения изменять активность KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 можно проводить с помощью наблюдения, например, способности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 связываться с их природными мишенями и изменять иммунную клеточную активность. Иммунная клетка может представлять собой Т-клетку, В-клетку или миелоидную клетку. Определение способности анализируемого соединения изменять способность KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 к связыванию с их рецепторами можно проводить, например, с помощью сливания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 с радиоизотопной или ферментативной меткой для наблюдения способности анализируемого соединения изменять способность KIR2DL1, KIR2DL2 KIR2DL3 к связыванию с Т-клетками, экспрессирующими рецептор к KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Определение способности анализируемого соединения к связыванию KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может осуществляться, например, с помощью сливания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 с радиоизотопной или ферментативной меткой таким образом, что связывание соединения с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 можно определить с помощью детекции меченных KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в комплексе.

Также данное изобретение дает возможность определить способность соединения взаимодействовать с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 без применения мечения взаимодействующих компонентов. Например, можно использовать микрофизиометр для определения взаимодействия соединения с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 без применения мечения KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. McConnell, H.M. et al. (1992), Science, 257:1906-1912. Микрофизиометр (например, цитосенсор) представляет собой аналитический инструмент для оценки скорости закисления клеткой окружающей среды с помощью адресуемого светом потенциометрического сенсора (LAPS). Изменения в скорости окисления могут использоваться в качестве индикатора взаимодействия между соединением и KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Анализ может представлять собой основанный на клетках анализ, включающий контактирование Т-клеток, экспрессирующих партнер связывания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, с тестовым соединением, и определение способности анализируемого соединения изменять (например, стимулировать или ингибировать) активность партнера связывания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Определение способности анализируемого соединения изменять активность партнера связывания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может осуществляться, например, с помощью определения способности полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 связываться или взаимодействовать с партнерами связывания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Определение способности полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или их биологически активных частей связываться или взаимодействовать с партнерами связывания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может осуществляться одним из описанных способов определения прямого связывания. В одном варианте определение способности полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или их биологически активных частей связываться или взаимодействовать с партнерами связывания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может осуществляться с помощью определения активности партнера связывания. Например, активность партнера связывания может быть определена с помощью определения индукции клеточного вторичного мессенджера (например, тирозинкиназной или фосфатазной активности), определения каталитической/ферментативной активности соответствующего субстрата, определения индукции репортерного гена (включая целевой регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей детектируемый маркер, например люциферазу) или определения клеточного ответа, регулируемого мишенью. Например, определение способности полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 связываться или взаимодействовать с природными партнерами связывания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может осуществляться с помощью оценки способности соединения изменять ко-стимуляцию иммунных клеток или ингибирование в пролиферативном анализе, или с помощью оценки вмешательства в способность полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 связываться с антителами, распознающими части полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. В одном варианте соединения, изменяющие активацию Т-клеток, могут быть идентифицированы с помощью определения способности соединений изменять пролиферацию Т-клеток или продукцию цитокинов. В одном варианте соединения, изменяющие активацию Т-клеток, могут быть идентифицированы с помощью определения способности соединений изменять пролиферацию Т-клеток или продукцию цитокинов при более чем одной концентрации антигена.

Анализ может представлять собой бесклеточный анализ, в котором полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или их биологически активные части контактируют с тестовым соединением, после чего определяют способность анализируемого соединения связываться с полипептидами KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или их биологически активными частями. Предпочтительно использование биологически активных частей полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в анализах в рамках настоящего изобретения, включая фрагменты, участвующие во взаимодействиях с молекулами, отличными от KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, например, по меньшей мере, частей внеклеточного домена, которые связываются с партнерами связывания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Связывание анализируемого соединения с полипептидами KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может быть определено как напрямую, так и косвенными методами, как описано выше.

Анализ может представлять собой бесклеточный анализ, в котором полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или их биологически активные части контактируют с тестовым соединением, после чего определяют способность анализируемого соединения изменять (например, стимулировать или ингибировать) активность полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или их биологически активных частей. Определение способности анализируемого соединения изменять активность полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может осуществляться, например, с помощью определения способности полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 связываться с мишенью KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 одним из перечисленных способов определения прямого связывания. При бесклеточных анализах в рамках настоящего изобретения используются как растворимые, так и мембраносвязанные формы полипептидов (например, полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или их биологически активные части или партнеры связывания, с которыми связываются KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3). В случае бесклеточных анализов, в которых используют мембраносвязанные формы полипептидов (например, KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 клеточной поверхности), желательно использование солюбилизирующего агента, такого, чтобы обеспечить поддержание в растворе мембраносвязанной формы полипептида. Примеры таких солюбилизрующих агентов включают неионные детергенты, такие как н-октилгликозид, н-додецилгликозид, н-додецилмальтозид, октаноил-н-метилглюкамид, деканоил-н-метилглюкамид, Тритон® X-100, Тритон® X-114, Тезит, изотридециполи(этиленгликолевый эфир), 3-[(3-холамидопропил)диметиламминио]-1-пропан сульфонат (CHAPS), 3-[(3-(холамидопропил)диметиламминио]-2-гидрокси-1-пропан сульфонат (CHAPSO) или N-додецил-N,N-диметил-3-аммино-1-пропан сульфонат.

В способах анализа может быть желательно иммобилизовать KIR2DL1, KIR2DL2 и ICIR2DL3 или их партнера связывания для улучшения разделения образовавших комплекс и не образовавших комплекс форм одного или всех полипептидов, а также для автоматизации анализа. Связывание анализируемого соединения с полипептидами KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или взаимодействие полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 с их партнером связывания в присутствии и в отсутствие соединения-кандидата, может осуществляться в любых сосудах, пригодных для содержания реактантов. Примерами таких сосудов являются микропланшеты, пробирки и микроцентрифужные пробирки. Может быть создан слитый белок, обеспечивающий возможность связывания с матрицей одного или всех полипептидов. Например, слитые белки глутатион-S-трансфераза/KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или слитые белки глутатион-S-трансфераза/партнер связывания могут быть адсорбированы на глутатионовых гранулах сефарозы SEPHAROSE® (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) или дериватизированном глутатионом микропланшете и затем совмещены с тестовым соединением или тестовым соединением и не адсорбирующимся партнером связывания полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, полученную смесь инкубируют в условиях, благоприятных для образования комплексов (например, при физиологических солевых условиях и pH).

После инкубации бусины или микропланшет промывают для удаления всех не связавшихся компонентов, в случае использования бусин матрицу иммобилизуют, и образование комплексов определяют прямыми или косвенными методами, например, как описано выше. Альтернативно, комплексы могут диссоциировать от матрицы, и уровень активности связывания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 определяют стандартными методами. Прочие техники иммобилизации полипептидов или матриц могут также быть использованы при скрининге в рамках настоящего изобретения. В альтернативном варианте, определение способности анализируемого соединения к изменению активности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 полипептида может осуществляться с помощью определения способности анализируемого соединения к изменению активности молекулы, функционирующей в сигнальном каскаде после KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, например взаимодействуя с цитоплазматическим доменом партнера связывания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Например, уровни содержания вторичных мессенджеров, активность взаимодействующей молекулы относительно соответствующей мишени или связывание взаимодействующей молекулы с соответствующей мишенью могут быть определены, как было описано ранее.

Модуляторы экспрессии KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут быть определены с помощью метода, при котором клетка контактирует с соединением-кандидатом, после чего измеряют экспрессию мРНК или полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в клетке. Уровень экспрессии мРНК или полипепти-

дов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 при наличии соединения-кандидата сравнивают с уровнем экспрессии мРНК или полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 при отсутствии соединения-кандидата. Соединение-кандидат затем, на основе данного сравнения, если изменение является статистически значимым, может быть определено как модулятор экспрессии KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут быть использованы в качестве "bait"-белка (белка, для которого ищут партнеров) при двугибридном анализе или тригибридном анализе (см., например, патент США № 5283317; Zervos, et al. (1993), Cell, 72:223-232; Madura, et.al. (1993), J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartel, et al. (1993), Biotechniques, 14:920-924; Iwabuchi, et.al. (1993), Oncogene, 8:1693-1696; and WO 94/10300) для идентификации других полипептидов, которые связываются или взаимодействуют с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 ("KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3-связывающие белки", "партнеры связывания KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3" или "KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3-bp") и вовлечены в активность KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Такие KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3-связывающие белки также могут быть вовлечены в передачу сигналов с помощью полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или мишеней ICIR2DL1, KIR2DL2 и ICIR2DL3, как, например, нижележащие элементы KIR2DL1, ICIR2DL2 и KIR2DL3-опосредованного сигнального пути. Альтернативно, такие KIR2DL1, ICIR2DL2 и ICIR2DL3-связывающие полипептиды могут быть ингибиторами KIR2DL1, ICIR2DL2 и KIR2DL3. Двугибридная система основана на модульной природе большинства транскрипционных факторов, которые состоят из разделенных ДНК-связывающих и активирующих доменов. Вкратце, при анализе используют две различных ДНК-конструкции. В одной конструкции ген, кодирующий полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, слит с геном, кодирующим ДНК-связывающий домен известного транскрипционного фактора (например, GAL-4). В другой конструкции ДНК-последовательность из библиотеки ДНК-последовательностей, кодирующая неизвестный полипептид ("pray" или "образец") слита с геном, кодирующим активационный домен известного транскрипционного фактора. Если полипептиды "bait" или "pray" способны взаимодействовать in vivo, образуя KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3-зависимый комплекс, то ДНК-связывающий и активационный домены сближаются. Близкое расположение обеспечивает транскрипцию репортерного гена (например, LacZ), функционально связанного с сайтом регуляции транскрипции, чувствительным к транскрипционному фактору. Экспрессию репортерного гена определяют, и колонии клеток, содержащие функционирующий транскрипционный фактор, могут быть выделены и использованы для получения клонируемого гена, кодирующего полипептид, взаимодействующий с полипептидами KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Сочетание двух или более анализов также описано здесь. Например, модулирующий агент может быть определен с использованием клеточного или бесклеточного анализа, и способность модулирующего агента изменять активность KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 полипептидов может быть подтверждена in vivo, например, в опытах на животных, таких, как модельный эксперимент клеточной трансформации и/или опухолеобразования в животных.

Настоящее изобретение также относится к новым агентам, предназначенным для описанного выше скрининга. Агент, как определено в описанных здесь способах, используют в подходящем модельном животном. Например, описанный здесь агент (например, агент, модулирующий KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3-специфичное антитело или KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3-связывающий партнер) можно использовать в модельном животном для определения эффективности, токсичности или побочных эффектов лечения с помощью такого агента. Альтернативно, описанный здесь агент можно использовать в модельном животном для определения механизма действия данного агента. Кроме того, данное изобретение касается использования новых агентов, идентифицированных описанным выше скринингом для описанного здесь лечения.

Анализы детекции.

Части или фрагменты последовательностей кДНК, определенные в данном документе (и соответствующие им полные последовательности генов) могут быть использованы несколькими способами в качестве полинуклеотидных реагентов. Например, эти последовательности могут быть использованы при 1) картировании соответствующих им генов на хромосоме, а также сопоставлении генных областей с генетическими заболеваниями; 2) идентификации индивидуума по биологическому образцу (идентификации тканей) и 3) судебной идентификации биологического образца. Эти применения описаны в подразделах далее.

Картирование хромосом.

При выделении последовательности (или часть последовательности) гена, эта последовательность может быть использована для картирования расположения гена на хромосоме. Этот процесс называется картированием хромосом. Соответственно, части или фрагменты нуклеотидных последовательностей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, описанные здесь, могут быть использованы для картирования расположения генов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 на хромосоме. Картирование последовательностей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 на хромосоме является первым важным шагом в сопоставлении этих последовательностей с генами ассоциированными с болезнью. Кратко, гены KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут быть картированы на хромосоме с помощью приготовления ПЦР-праймеров (предпоч-

тительно 15-25 нуклеотидов длиной) на нуклеотидные последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Компьютерный анализ последовательностей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может быть использован для составления праймеров, которые не выходят за пределы одного экзона на геномной ДНК, усложняя тем самым процесс амплификации. Данные праймеры могут затем быть использованы для скрининга гибридов соматических клеток, содержащих индивидуальные хромосомы человека. Только гибриды, содержащие человеческие гены, соответствующие последовательностям KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, дадут в результате амплифицированный фрагмент. Гибриды соматических клеток получают с помощью слияния соматических клеток различных млекопитающих (например, клеток человека и мыши). По мере того, как гибриды клеток человека и мыши растут и делятся, они постепенно теряют человеческие хромосомы в случайном порядке, но оставляют мышиные хромосомы. При использовании среды, в которой клетки мыши не могут расти, так как не экспрессируют конкретный фермент, а клетки человека могут, останется одна человеческая хромосома, содержащая ген, кодирующий нужный фермент. С помощью использования различных сред может быть установлен набор гибридных клеточных линий. Каждая клеточная линия в наборе включает единичную хромосому человека или небольшое число хромосом человека, а также полный набор хромосом мыши, позволяющий легко картировать отдельные гены на специфических хромосомах человека. D'Eustachio, et al. (1983), Science, 220:919-924. Гибриды соматических клеток, содержащие только фрагменты хромосом человека, также могут создаваться с использованием хромосом человека, несущих транслокации и делеции.

ПЦР-картирование гибридов соматических клеток - это быстрая процедура для сопоставления конкретной последовательности с конкретной хромосомой. Три или более последовательности могут быть сопоставлены в день при использовании одного амплификатора. С использованием нуклеотидных последовательностей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 для дизайна олигонуклеотидных праймеров можно определить расположение в панели фрагментов специфичных хромосом. Другие стратегии картирования, которые также могут быть использованы для картирования последовательностей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 на их хромосоме, включают гибридизацию in situ (описано в Fan, et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6223-27), предварительный отбор с мечеными поточно-сортированными хромосомами и предварительный отбор с помощью гибридизации с хромосомо-специфичной библиотекой кДНК.

Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) последовательности ДНК с метафазным хромосомным препаратом может быть использована далее для определения точного местоположения на хромосоме в одну стадию. Хромосомные препараты могут быть созданы с использованием клеток, деление которых было блокировано в метафазе химическими соединениями, такими как колцемид, разрушающий веретена деления. Хромосомы могут быть быстро обработаны трипсином, а затем окрашены по Гимзе. На каждой хромосоме образуется индивидуальный узор из светлых и темных полос. Техника FISH может быть применима к последовательностям ДНК длиной по меньшей мере 500 или 600 нуклеотидов,. хотя клоны длиной более 1000 нуклеотидов имеют более высокую вероятность связывания с уникальной точкой на хромосоме с достаточной интенсивностью сигнала для простого обнаружения. Предпочтительно длина в 1000 нуклеотидов и более предпочтительно, длина 2000 нуклеотидов обеспечит хорошие результаты в разумные сроки. Для обзора данной техники см. Verma et al., Human Chromosomes: A Manual of basic Techniques (Pergamon Press, New York 1988). Реагенты для картирования хромосом могут использоваться отдельно для мечения единичной хромосомы или единичного участка на конкретной хромосоме, или панели реагентов могут использоваться для мечения нескольких сайтов и/или нескольких хромосом. Реагенты, соответствующие некодирующим участкам генов, на самом деле являются предпочтительными для целей картирования. Кодирующие последовательности имеют больше шансов оказаться консервативными в пределах семейств генов, тем самым увеличивая вероятность перекрестной гибридизации при картировании хромосом.

После того, как последовательность была сопоставлена с точным местоположением на хромосоме, физическое положение последовательности на хромосоме может быть сопоставлено с результатами исследований генетической карты. В конечном счете, полное секвенирование генов от нескольких людей может быть выполнено для подтверждения наличия мутаций, а также для того, чтобы отличить мутации от полиморфизмов.

Определение тканей.

Последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 настоящего изобретения могут также использоваться для идентификации пациентов по микроскопическим биологическим образцам. Кроме того, последовательности настоящего изобретения могут использоваться в альтернативной технике, дающей возможность определить фактическую основание-за-основанием последовательность ДНК выбранных частей генома пациента. Таким образом, нуклеотидные последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, описанные здесь, могут быть использованы для получения двух ПЦР-праймеров для 5'- и 3'-конца последовательностей. Эти праймеры могут затем быть использованы для амплификации ДНК пациента и затем ее секвенирования.

Панели соответствующих последовательностей ДНК от пациентов, приготовленные таким образом, могут обеспечить уникальные индивидуальные коды, так как каждый пациент будет иметь уникальный набор таких последовательностей ДНК вследствие аллельных различий. Последовательности настоящего

изобретения могут быть использованы для получения таких идентификационных последовательностей от пациентов и из тканей. Нуклеотидные последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 настоящего изобретения представляют собой уникальные части генома человека. Аллельные различия возникают в некоторой степени в кодирующих областях данных последовательностей и в большей степени в некодирующих областях. По оценкам, аллельные изменения между отдельными людьми возникают с частотой около одного раза на каждые 500 оснований. Каждая из последовательностей, описанных здесь, в некоторой степени, может быть использована как стандарт, с которым может сравниваться ДНК пациента для целей определения. Вследствие того, что большая часть полиморфизмов возникает в некодирующих областях, требуется меньшее число последовательностей для дифференциации пациентов. Некодирующие последовательности SEQ ID NO: 1 или 4 могут обеспечивать положительную индивидуальную идентификацию с набором от, возможно, 10 до 1000 праймеров, каждый из которых обеспечивает амплификацию некодирующей последовательности длиной 100 оснований. Если используют предсказанные кодирующие последовательности, такие как в SEQ ID NO: 3 или 6, более подходящим числом праймеров для положительной индивидуальной идентификации будет 500-2000.

Если набор реагентов из нуклеотидных последовательностей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, описанных здесь, используют для создания уникальной идентификационной базы данных для пациента, те же самые реагенты могут затем использоваться для определения ткани от того пациента. С использованием уникальной идентификационной базы данных можно осуществлять положительную идентификацию пациента, живого или мертвого, по очень маленькому образцу ткани.

Применение последовательностей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в судебной биологии.

Основанные на применении ДНК идентификационные техники могут быть также использованы в судебной биологии. Последовательности настоящего изобретения могут использоваться для создания полинуклеотидных реагентов, например, ПЦР-праймеров, направленных на специфические локусы генома человека, способные усилить достоверность судебных идентификаций, основанных на применении ДНК, например, обеспечить новый "маркер идентификации" (т.е. другую последовательность ДНК, которая является уникальной для отдельного пациента). Как было замечено ранее, информация о конкретной последовательности оснований можно использовать для идентификации в качестве точной альтернативы паттернам, образуемым фрагментами после обработки рестрикционными ферментами. Последовательности, направленные на некодирующие области SEQ ID NO: 1 или 3, в общем подходят для подобного применения, так как большее число полиморфизмов возникает в некодирующих областях, облегчая дифференциацию пациентов с использованием данной техники. Примерами полинуклеотидных реагентов являются нуклеотидные последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или их фрагменты, например фрагменты, выделенные из некодирующих областей SEQ ID NO: 1 или 3, длиной по меньшей мере 20 оснований, предпочтительно по меньшей мере 30 оснований. Описанные здесь нуклеотидные последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут затем быть использованы для создания полинуклеотидных реагентов, например, меченых или способных быть мечеными зондов, которые можно использовать при, например, in situ гибридизации для определения специфической ткани, например, лимфоцитов Это может быть очень полезно в случаях, когда судебному патологоанатому предъявляют ткань неизвестного происхождения. Наборы таких KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 зондов могут быть использованы для определения ткани по видам и/или по типу органов. Аналогичным образом, данные реагенты, например KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 праймеры или зонды, могут быть использованы для проверки культуры ткани на загрязнение (т.е. проверки на наличие смеси различных типов клеток в культуре).

Диагностические анализы.

Способ детекции наличия или отсутствия полипептидов или нуклеиновых кислот KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в биологических образцах включает получение биологического образца от тестируемого объекта и взаимодействие биологического образца с соединением или агентом, способным к детекции полипептидов или нуклеиновых кислот KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 (например, мРНК или геномной ДНК), кодирующих полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, таким образом, чтобы наличие полипептидов или нуклеиновых кислот KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 было детектировано в биологическом образце. Предпочтительным агентом для детекции мРНК или геномной ДНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 является меченый нуклеотидный зонд, способный гибридизоваться с мРНК или геномной ДНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Нуклеотидным зондом могут быть, например, нуклеотидные последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, приведенные в SEQ ID NO: 1 или 3, или их части, такие как олигонуклеотиды, по меньшей мере 15, 30, 50, 100, 250 или 500 нуклеотидов длиной, и способные специфично гибридизоваться в жестких условиях с мРНК или геномной ДНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Другие зонды, подходящие для применения в диагностическом анализе, описаны здесь. Предпочтительными агентами для детекции полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 являются антитела, способные связываться с полипептидами KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, предпочтительно антитела с детектируемой меткой. Антитела могут быть поликлональными или, что более предпочтительно, моноклональными. Могут быть использованы как целые антитела, так и их фрагменты (например, Fab или $F(ab')_2$). Термин "меченый", применяемый по отношению к зонду или антителу, обозна-

чает прямое мечение зонда или антитела путем связывания (т.е. физического связывания) детектируемого вещества с зондом или антителом или не прямое связывание зонда или антитела с помощью его реактивности по отношению к другому реагенту, который является непосредственно меченым. Примеры непрямого мечения включают детекцию первичных антител с использованием флуоресцентно меченных вторичных антител и мечение по концам ДНК-зонда с помощью биотина, чтобы затем детектировать его флуоресцентно меченным стрептавидином. Термин "биологический образец" включает обозначение тканей, клеток и биологических жидкостей, полученных от субъекта. Следовательно, способ детекции в рамках настоящего изобретения может быть использован для детекции мРНК, полипептидов или геномной ДНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в биологических образцах как in vitro, так и in vivo. Например, in vitro методики для детекции мРНК PD-L2 включают Нозерн гибридизацию и in situ гибридизацию. In vitro техники для детекции полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 включают фермент-связанный иммуносорбентный анализ (ELISA), Вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию и иммунофлуоресценцию. In vitro техники для детекции геномной ДНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 включают гибридизацию по Саузерну. Кроме того, in vivo техники для детекции полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 включают введение в субъекта меченых анти-KIR2DL 1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антител. Например, антитела могут быть мечены радиоактивной меткой, наличие и местонахождение которой может быть детектировано у субъекта с помощью стандартных техник визуализации. Биологический образец содержит молекулы полипептидов анализируемого субъекта. Альтернативно, биологический образец содержит молекулы мРНК от анализируемого субъекта или молекулы геномной ДНК от анализируемого субъекта. Предпочтительным биологическим образцом является образец сыворотки, полученный обычными способами от субъекта. В другом варианте способ далее включает получение контрольного биологического образца от контрольного субъекта, взаимодействие контрольного образца с соединением или агентом, способным детектировать полипептиды, мРНК или геномную ДНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, таким образом, чтобы определить наличие полипептидов, мРНК или геномной ДНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в биологическом образце и сравнить наличие полипептидов, мРНК или геномной ДНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в контрольном образце с наличием полипептидов, мРНК или геномной ДНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в анализируемом образце.

Изобретение также включает в себя наборы реактивов для определения наличия KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в биологическом образце. Например, набор реактивов может включать меченое соединение или агент, способные детектировать полипептиды или мРНК KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в биологическом образце; средства для определения количества KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в образце и средства для сравнения количества KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 в образце со стандартом. Соединение или агент могут быть упакованы в подходящую емкость. Набор реактивов может также включать инструкции по использованию набора реактивов для детекции полипептидов или нуклеиновых кислот KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Прогностические анализы.

Диагностические методы, описанные здесь, могут быть использованы для определения субъектов, обладающих предрасположенностью к развитию заболевания или расстройства, связанного с аномальной или нежелательной экспрессией или активностью KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Используемый здесь термин "аномальный" обозначает экспрессию или активность KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, которая отличается от экспрессии или активности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 дикого типа. Аномальная экспрессия или активность включает повышенную или пониженную экспрессию или активность, которая не повторяет паттерн развития экспрессии или субклеточный паттерн экспрессии дикого типа. Например, аномальная экспрессия или активность KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 встречается в случае, когда мутации в гене KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 приводят к пониженной экспрессии или сверхэкспрессии гена KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, что приводит к нефункциональным полипептидам KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или к полипептидам, функционирующим иначе, чем в диком типе, например полипептид не взаимодействует с партнером по связыванию KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 или полипептид взаимодействует не с партнером по связыванию KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Используемый здесь термин "нежелательный" включает нежелательное явление, являющееся частью биологического ответа, например, активацию иммунных клеток. Например, термин "нежелательный" включает экспрессию или активность KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, которая является нежелательной у субъекта.

Анализы, описанные здесь, такие как описанная выше диагностика или последующие анализы, могут быть использованы для определения субъекта, имеющего предрасположенность к развитию заболевания, связанного с расстройством регуляции, активности или экспрессии полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, таким как аутоиммунное расстройство, аутоиммунодефицитное расстройство, расстройство функционирования иммунной системы, такое как аутоиммунность, аллергическое или воспалительное заболевание, или рак. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способ определения болезни или расстройства, связанного с аномальной или нежелательной экспрессией или активностью KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, при котором анализируемый образец получают от субъекта, и полипептиды или нуклеиновые кислоты KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 (например, мРНК или геномная ДНК) детектируют, причем наличие полипептидов или нуклеиновых кислот KIR2DL1, KIR2DL2 и

KIR2DL3 представляет собой диагностику для субъекта, имеющего предрасположенность к развитию заболевания или расстройства, связанного с аномальной или нежелательной экспрессией или активностью KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Используемое здесь понятие "анализируемый образец" обозначает биологический образец, полученный от интересующего субъекта. Например, анализируемый образец может представлять собой биологическую жидкость (например, цереброспинальную жидкость или сыворотку), образец клеток или ткани.

Кроме того, прогностические анализы, описанные здесь, могут быть использованы для определения возможности введения субъекту агента (например, агониста, антагониста, пептидомиметика, полипептида, пептида, нуклеиновой кислоты, низкомолекулярного соединения или другого препарата) для лечения заболевания или расстройства, связанного с аномальной или нежелательной экспрессией или активностью KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Например, такие способы могут быть использованы для определения того, можно ли эффективно лечить субъекта агентом от аутоиммунного расстройства, иммунодефицита, рака иммунной системы или аллергического или воспалительного заболевания. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способы определения того, можно ли эффективно лечить субъекта агентом от расстройств, связанных с аномальной или нежелательной экспрессией или активностью KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, при которых получают анализируемый образец и определяют экспрессию или активность полипептидов или нуклеиновых кислот KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 (например, повышенная экспрессия или активность полипептидов или нуклеиновых кислот KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 является диагностикой для субъекта, которому могут вводить агент для лечения расстройства, связанного с аномальной или нежелательной экспрессией или активностью KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3). Способы, представленные в изобретении, могут также быть использованы для определения генетических изменений в гене KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, тем самым определяя наличие у субъекта с измененным геном предрасположенности к развитию расстройства, характеризуемого нарушением регуляции активности полипептидов или экспрессии нуклеиновых кислот KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, такому как аутоиммунное заболевание, иммунодефицит, рак иммунной системы, аллергическое заболевание или воспалительное заболевание. Способы, описанные здесь, могут осуществляться, например, с помощью применения предварительно подготовленных наборов реактивов для диагностики, включающих по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, служащую зондом, или реагент, служащий антителом, описанный здесь, удобные для применения, например, в клинических условиях для диагностики пациентов с выраженными симптомами или наличием в истории семьи заболевания, связанного с геном KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Кроме того, любой тип клеток или тканей, в которых экспрессируются KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, можно использовать для описанных здесь прогностических анализов.

Иммуноанализы.

KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела и антигенсвязывающие фрагменты, связывающиеся с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут быть использованы в иммунологических анализах для качественного или количественного обнаружения и анализа маркеров в образце. Этот способ включает обеспечение антителами, специфически связывающимися с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3; взаимодействие образца с антителом и детекцию наличия комплекса антитела, связанного с маркером в образце.

KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 могут быть обнаружены и/или количественно оценены при помощи любого метода из ряда хорошо известных иммунологических анализов связывания. Используемые анализы включают, например, ферментные иммунные анализы (ELA), такие как ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RLA), Вестерн-блоттинг или слот-блоттинг анализ. См., например, патенты США № 4366241; 4376110; 4517288 и 4837168. Как правило, образец, полученный от субъекта, может быть введен в контакт с антителом, специфически связывающимся с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Возможно, что антитела могут быть закреплены на твердой подложке, чтобы облегчить отмывание и последующее выделение комплекса перед контактированием антитела с образцом. Примерами твердых носителей являются стекла или пластик в виде, например, микропланшета, стержней, бусин или микробусин. Антитела могут быть присоединены к твердой подложке.

После инкубации образца с антителами смесь отмывают, и сформировавшийся комплекс маркера с антителом может быть детектирован. Это может осуществляться при помощи инкубации отмытой смеси с реагентом для детекции. Альтернативно, маркер в образце может быть детектирован с помощью непрямого анализа, в котором, например, второе меченое антитело используют для детекции связанного маркер-специфичного антитела, и/или с помощью конкурентного или ингибирующего анализа, где, например, моноклональные антитела, связывающиеся с отдельным эпитопом маркера, инкубируют одновременно со смесью.

Во время проведения опытов инкубации и/или отмывания могут потребоваться после каждой комбинации реагентов. Время инкубации варьирует от около 5 с до нескольких часов, предпочтительно от около 5 мин до около 24 ч. Тем не менее время инкубации будет зависеть от способа проведения опыта, а также от применяемого маркера, объема раствора и концентраций. Обычно опыты проводят при комнатной температуре, хотя они могут проводиться при различных температурах (например, 10-40°C).

Иммуноанализ можно использовать для определения количества анализируемого маркера в образце, полученном от пациента. Во-первых, анализируемое количество маркера в образце может быть определено с использованием методов иммуноанализа, описанных ранее. Если маркер присутствует в образце, он будет включаться в комплексы антитело-маркер с антителами, специфически связывающимися с маркером в подходящих условиях, описанных ранее. Количество комплексов антитело-маркер может быть определено при помощи сравнения со стандартом. Как было отмечено выше, анализируемое количество маркера необязательно должно оцениваться в абсолютных единицах, так как единицы измерения могут сравниваться с контрольным количеством и/или сигналом. В уровне техники известно несколько иммуноанализов, и полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, описанные здесь, могут быть использованы в таких иммуноанализах, включая радиоиммуноанализ (RIA), фермент-связанный иммуносорбентный анализ (ELISA), магнитный иммуноанализ, иммуноблоттинг, Вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, иммуногистохимический анализ и флуоресцентно-активированный сортинг клеток (FACS). См. Wild, (2008) [Ed.] The Immunoassay Handbook [3rd Ed.] Elsevier.

Способы радиовизуализации.

Анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела могут быть использованы в методах радиовизуализации для диагностики раковых заболеваний, включая рак поджелудочной железы и колоректальный рак, и наблюдения развития опухолей. Данные методы включают позитронно-эмиссионную томографию (PET), однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (SPECT). Обе эти техники являются неинвазивными и могут быть использованы для детекции и/или оценки широкого спектра событий, происходящих в тканях, и/или функций тканей, как, например, детекции раковых клеток. SPECT можно использовать с включением двух меток одновременно. См. патент США № 6696686.

Коммерческие применения и методы.

Настоящее изобретение также обеспечивает получение анти-KIR2DL 1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антител в коммерческих количествах. Анти-KIR2DL 1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела могут быть произведены в больших масштабах, храниться, если потребуется, и поставляться в больницы, врачам или в другие медицинские учреждения.

Получение, хранение и распространение анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антител могут быть обеспечены способами, описанными здесь. После производства анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела могут быть собраны, очищены и, возможно, храниться до начала лечения пациента. Например, как только у пациента диагностировали, например, рак, аутоиммунное заболевание или воспалительное заболевание, анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 антитела могут быть своевременно прописаны и предоставлены. Соответственно, настоящее изобретение относится к способам получения KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 для производства антител в промышленных масштабах, фармацевтических композиций, содержащих антитела и их антигенсвязывающие части, которые селективно связываются с KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, а также способам обеспечения (т.е. получение, возможное хранение и продажа) антителами анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 больниц и врачей. Производство антител анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может быть расширено для коммерческого применения.

Настоящее изобретение также обеспечивает способы ведения фармацевтического бизнеса, включая создание системы распространения для распространения и подготовки к продажам, или может включать создание групп продаж по маркетингу фармацевтического препарата.

Библиотека нуклеиновых кислот.

Смешанная библиотека вариантов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может быть создана с помощью комбинаторного мутагенеза на уровне нуклеиновых кислот и закодирована с помощью смешанной генной библиотеки. Смешанная библиотека вариантов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 может быть создана, например, с помощью ферментативного лигирования смеси синтетических олигонуклеотидов в генные последовательности таким образом, чтобы получить вырожденный набор потенциальных последовательностей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, экспрессируемых в виде отдельных полипептидов или, альтернативно, в виде набора больших слитых белков (например, для фагового дисплея), включающего набор последовательностей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Существует множество способов, которые можно использовать для создания библиотек потенциальных вариантов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 из вырожденной олигонуклеотидной последовательности. Химический синтез вырожденной последовательности гена может быть выполнен в автоматическом ДНК-синтезаторе, и синтетический ген затем может быть лигирован в подходящий экспрессионный вектор. Использование вырожденного набора генов позволяет обеспечить наличие в одной смеси всех последовательностей, кодирующих желаемый набор потенциальных последовательностей KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Способы синтеза вырожденных олигонуклеотидов известны в данной области. См., например, Narang (1983), Tetrahedron 39:3; Itakura, et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura, et al. (1984), Science 198:1056; Ike, et al. (1983, Nucleic Acids Res. 11:477.

Кроме того, библиотеки фрагментов последовательностей, кодирующих полипептиды KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3, могут быть использованы для создания смешанной популяции фрагментов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 для проверки и последующего отбора вариантов полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3.

Библиотека фрагментов кодирующих последовательностей может быть создана с помощью обработки двухцепочечного ПЦР фрагмента кодирующей последовательности KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 нуклеазой при условиях, когда образуется только один одноцепочечный разрыв на молекулу, денатурации двухцепочечной ДНК, с последующей ренатурацией ДНК для формирования двухцепочечной ДНК, которая может включать смысловые/антисмысловые пары от различных продуктов с одноцепочечным разрывом, и удаления одноцепочечных частей из перестроенных дуплексов с помощью обработки SI нуклеазой, и лигирования получившейся библиотеки фрагментов в экспрессионный вектор. С помощью данного способа можно создать экспрессионную библиотеку, кодирующую N-концевую, С-концевую и внутренние части полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 различных размеров.

В данной области известно несколько методик для проверки генных продуктов комбинаторных библиотек, созданных с помощью точечных мутаций или усечения, и для проверки кДНК библиотек на генные продукты, обладающие нужными свойствами. Подобные методики адаптированы для быстрой проверки генных библиотек, созданных с помощью комбинаторного мутагенеза полипептидов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3. Наиболее широко используемые техники, пригодные для высокопроизводительного анализа для проверки больших генных библиотек, обычно включают клонирование генной библиотеки в реплицируемые экспрессионные векторы, трансформацию подходящих клеток полученной библиотекой векторов и экспрессию комбинаторных генов в условиях, при которых детекция желаемой активности облегчает выделение вектора, кодирующего ген, продукт которого был обнаружен. Для идентификации вариантов KIR2DL1, KIR2DL2 и KIR2DL3 можно использовать рекурсивный групповой мутагенез (REM), новый метод, повышающий частоту функциональных мутантов в библиотеках, в сочетании со скринингом. Arkin and Youvan (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:7811-7815; Delagrave et al. (1993), Protein Eng. 6(3):327-331.

Все публикации (например, не патентная литература), патенты, опубликованные патентные заявки и патентные заявки, упомянутые в этом описании, указывают на уровень профессионализма специалистов в данной области, к которой относится данное изобретение. Все подобные публикации (например, не патентная литература), патенты, опубликованные патентные заявки и патентные заявки включены в настоящее описание путем ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, опубликованная патентная заявка или патентная заявкабыли конкретно и индивидуально указаны включенными в качестве ссылок.

Описание настоящего изобретения станет более понятным с учетом следующих примеров, которые включены только в целях иллюстрации конкретных аспектов и вариантов воплощения настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

Примеры

Пример 1. Фармакокинетика у пациентов.

Концентрации в плазме анти-KIR (1-7F9) были определены с помощью ELISA, как было кратко описано выше.

Планшеты покрывали KIR2DL3 покрывающим раствором (100 мкл/лунка) и инкубировали в течение ночи при около 4°С. Планшеты затем промывали 3 раза буфером для промывания, используя автоматический промыватель планшетов (400 мкл/лунка). Добавляли блокирующий буфер (200 мкл на лунку) и планшеты инкубировали около 2 ч на встряхивателе для планшетов при комнатной температуре. После этого планшеты опять промывали 3 раза буфером для промывания (400 мкл/лунка).

Стандарты, контроли качества и образцы добавляли в планшеты (100 мкл/лунка) перед инкубацией в течение около 2 ч на встряхивателе для планшетов при комнатной температуре. Перед добавлением рабочего раствора мышиных анти-IgG4 человека:пероксидаза (100 мкл/лунка) планшеты промывали еще 3 раза (как и ранее). Планшеты затем опять инкубировали в течение около 2 ч на встряхивателе для планшетов при комнатной температуре, после чего промывали еще раз.

В планшеты добавляли TMB (100 мкл/лунка), которые затем инкубировали в течение около 30 мин на встряхивателе для планшетов при комнатной температуре. Ферментативную реакцию останавливали добавлением останавливающего раствора (50 мкл/лунка). Поглощение определяли при 450 нм (фильтр сравнения при 650 нм). Нижний предел количественного измерения для данного исследования составляет 5,000 нг/мл, а верхний предел количественного измерения для данного исследования составляет 110,0 нг/мл.

Пример 2. Анализ насыщения KIR.

Насыщение рецепторов оценивали в образцах цельной крови человека с помощью четырехцветного флуоресцентного анализа. Вкратце, уровни свободных и связанных рецепторов KIR2D оценивали на Т- и NK-лимфоцитах в периферической крови с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Анализ на свободные сайты оценивал несвязанные KIR2D с помощью окрашивания PE-конъюгированными 1-7F9, которые связываются с молекулой KIR2D. Анализ на связавшиеся сайты оценивал рецепторы KIR2D, занятые 1-7F9, с помощью окрашивания PE-конъюгированными мышиными анти-IgG4 человека моноклональными антителами, которые узнают 1-7F9, связанный с рецепторами KIR2D. Анализы на свободные и связанные сайты позволяют оценить как процентное соотношение положительного окрашивания, так и интенсивность флуоресценции [MESF] 1-7F9-PE или анти-hIgG4-PE. Следующие комбинации конъюгированных

антител использовали в следующих двух анализах:

Анализ на свободные сайты: CD3/1-7F9/CD45/CD56.

Анализ на связанные сайты: CD3/hIgG4/CD45/CD56.

Образцы анализировали на цитометре Becton Dickinson FACScalibur с использованием программного обеспечения Becton Dickinson Cellquest. Т-клетки определяли как $CD45^+CD3^+$ лимфоциты и NK-клетки определяли как $CD45^+CD3^-CD56^+$ клетки.

Пример 3. Клиническая безопасность и аутореактивность.

Исследование с повышением единичной дозы проводили среди пожилых (>60 лет) пациентов с острой миелоидной лейкемией (AML) во время их первой полной ремиссии после индукционной и консолидирующей химиотерапии, которым не показана пересадка костного мозга. Был применен стандартный подход 3+3 и исследованы в общей сложности 7 уровней доз: дозы варьировали от 0,0003 до 3 мг/кг. После дозирования пациентов исследовали на безопасность препарата, PK и насыщение KIR до тех пор, пока насыщение KIR возможно было детектировать.

Также было проведено продолженное исследование. Пациенты с AML, прошедшие исследование с повышением дозы и все еще находящиеся в состоянии полной ремиссии, могли участвовать в продолженном исследовании, при котором пациенты получали дозу препарата до 6 раз с введением ежемесячно. Пациенты получали ту же дозу, что и в предыдущем опыте.

Пациенты, материалы и методы.

В обоих опытах для исследований были отобраны пожилые пациенты с AML (>60 лет) в период их первой полной ремиссии (ПР) и не подходящие для трансплантации. AML диагностировали согласно критерию WHO (Brunning R.D., Matutes E., Harris N.L. et al.: Acute myeloid leukaemia: Introduction. In Jaffe E.S., Harris N.L., 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, p. 77-80). Ремиссия представляла собой морфологически полную ремиссию, определенную согласно критерию NCI (Cheson et al. JCO, 21(24): 4642-4649 (2003)) или CRi с неполным восстановлением количества тромбоцитов: только после 1 или 2 циклов индукционной химиотерапии и по меньшей мере 1 и максимально 6 циклов консолидирующей химиотерапии.

В процессе исследования с повышением дозы время, прошедшее с момента принятия последней дозы химиотерапии, составляло по меньшей мере 30 дней, но не более 120 дней. Другие критерии допустимости включали экспрессию KIR2DL1 и 2/3 на NK-клетках, ECOG (Oken, 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 от токсического воздействия после предыдущего лечения, но не ограничиваются ими.

Для продолженного исследования дополнительным критерием допустимости служило завершение исследования с повышением дозы с допустимым профилем безопасности.

Добавочные критерии включали абсолютное число нейтрофилов $>1\times10^9$/л, тромбоцитов $>80\times10^9$/л, отсутствие симптомов заболевания, восстановление после острой токсичности всех принимаемых ранее противолейкемических препаратов, экспрессию KIR на NK-клетках пациента (способность связывать анти-KIR(1-7F9)), отсутствие серьезных нарушений в работе органов, оцененных исследователем и данные лабораторных анализов, как описано далее: (a) содержание креатинина в сыворотке <2 мг/дл, (b) общее содержание билирубина < 1,5×верхний предел нормальных значений и (c) AST < 3×верхний предел нормальных значений

Схема исследования.

Исследование с повышением дозы представляло собой многоцентровое открытое исследование с повышением единичной дозы на безопасность и переносимость. Были исследованы семь уровней доз: 0,0003, 0,003, 0,015, 0,075, 0,3, 1 и 3 мг/кг. Для данного исследования была выбрана общая схема (3+3). Каждый пациент принимал одну дозу, после чего анализировали безопасность, фармакокинетику и фармакодинамику до тех пор, пока на NK-клетках пациента детектировали насыщение KIR. Безопасность, PK и насыщение KIR анализировали на постоянной основе и на основе данных, полученных в течение первых 4 недель после получения дозы для группы, принимающей каждую дозу, обычно принимали решение о повышении дозы.

Продолженное исследование проводили как многоцентровое открытое исследование с повторяющимся дозированием на безопасность и переносимость. Доза, которую давали отдельному пациенту, была одинаковой с дозой, полученной пациентом при исследовании с единичной дозой. Пациент мог получать 6 инъекций с 4-недельным интервалом, т.е. 6 циклов дозирования с максимальной длительностью в 6 месяцев. Каждый цикл дозирования включает в себя проведение дозирования и наблюдение безопасности. После последнего дозирования пациента наблюдали на безопасность до тех пор, пока детектировалось насыщение KIR на NK-клетках пациента. Продолжительность этого последующего периода оценки безопасности, вероятно, зависит от полученной дозы и предположительно максимально должно составить 24 недели после последней дозы.

Безопасность (т.е. любую наблюдаемую токсичность) от введения анти-KIR (1-7F9) оценивали с использованием критериев оценки степени тяжести наиболее частых нежелательных явлений Национального Института рака США (CTCAE) версии 3.0. Также были оценены фармакокинетические конечные точки, насыщение KIR, маркеры NK и Т-клеточной активации, маркер опухоли WT-1, выживаемость без прогрессировать и общая выживаемость.

Результаты.

Насыщение рецепторов оценивали в исследовании с повышением дозы у пациентов, каждый из которых получал дозу 0,0003, 0,003, 0,015, 0,075, 0,3, 1 и 3 мг/кг. В результате введения дозы 0,0003 мг/кг наблюдалось частичное насыщение KIR (50% насыщения) в течение около 2 ч; введение дозы 0,003 мг/кг приводило к полному насыщению KIR (90% насыщения) в течение менее 24 ч; введение дозы 0,015 мг/кг приводило к полному насыщению KIR в течение менее 7 дней; введение дозы 0,075 мг/кг приводило к полному насыщению KIR в течение почти 7 дней; введение дозы 0,3 мг/кг приводило к полному насыщению KIR в течение более 7, но менее 14 дней; введение дозы 1 мг/кг приводило к полному насыщению KIR в течение менее 3 недель (между 2 неделями и 3 неделями); введение дозы 3 мг/кг приводило к полному насыщению KIR в течение более 4 недель.

Никаких негативных событий, связанных с аутореактивностью (таких как кожная сыпь или желудочно-кишечные симптомы), инфузией (таких как сыпь, зуд, эритема, усталость, головная боль, лихорадка) или выбросом цитокинов (таких как лихорадка, усталость, недомогание и головная боль) не возникало в степени, превышающей нормы безопасности.

Пример 4. Эффективность устранения ConA бластов in vivo в модели на трансгенных мышах.

Индукцию NK-опосредованного уничтожения cw3-экспрессирующих ConA бластов in vivo оценивали в KIR2DL3 трансгенной мыши, получающей анти-KIR2DL1, 2 и 3 антитела 1-7F9.

Материалы и методы.

Антитела: полностью человеческие анти-KIR2DL 1, 2 и 3 моноклональные антитела 1-7F9 были получены с помощью иммунизации мышей, несущих геномный локус IgG человека (Medarex, Inc.), клетками линии BW5417, стабильно трансфицированными KIR2DL1, с последующими тремя повторными иммунизациями растворимой внеклеточной частью KIR2DL3, полученной из Escherichia coli, как описано в WO 2006/003179. Антитела были проверены на связывание с рекомбинантными растворимыми KIR с помощью фермент-связанного иммуносорбентного анализа, и положительные клоны были проверены на связывание с YTS-KIR2DL1 клетками с помощью проточной цитометрии. Выбранные гибридомы субклонировали до получения стабильных линий клеток.

Трансгенные мыши: Rag-/- мышей и трансгенных по KIR2DL3 (tg) мышей скрестили для получения KIR2DL3tg, Rag-/- мышей. HLA-Cw3 трансгенных мышей скрестили с KbDb-/- мышами, получив Cw3tg, KbDb-/- мышей. Мыши описаны в Romagne et al., (2009), Blood, 114: 2667-2677, а также в Sola et al. (2009), P.N.A.S. U.S.A. 106(31):12879-12884.

Анализ на отторжение, основанный на флуоресценции: анализы выполняли согласно способам, описанным лабораторией K. Karr (Oberg et al. Eur. J. Immunol (2004), 34:1646; S. Johansson, et al. J. Exp. Med (2005), 201:1145). За введением CFSE-меченых клеток-мишеней (тест с клетками-мишенями и сингенными/контрольными клетками-мишенями в соотношении 1:1) следовал анализ различных органов через 1 или 2 дня. Клетки-мишени представляли собой свежевыделенные клетки селезенки, опухолевые клетки или ConA бластные клетки (48 ч, ConA 2 мкг/мл).

Результаты.

Целью эксперимента стало определение того, индуцируют ли 1-7F9 уничтожение NK-клетками cw3-ConA бластных клеток-мишеней в KIR2DL3 tg мышах. Вкратце, реципиентные мыши и донорные клетки представляли собой следующее:

мыши-реципиенты KIR2DL3 tg B6, KIR2DL3 tg Rag-/- и C57/Bl6 мыши,

донорные клетки:

наивные клетки селезенки от KbDb KO мышей, KbDb KO cw3 tg мышей, C57/Bl6 мышей и

ConA бласты от KbDb KO мышей, KbDb KO cw3 tg мышей, C57/Bl6 мышей.

Клетки селезенки от C57/Bl6 и KbDb-/-cw3 tg мышей стимулировали в течение 2 дней ConA (2 нг/10^7 клеток/мл). Клетки были мечены 0,5 мкМ (B6) и 3 мкМ (KbDb-/-cw3) CFSE, смешанными в соотношении 1:1, затем их вводили в KIR2DL3tg B6 мышей, которым предварительно вводили или не вводили 1-7F9 mAb (300 мкг). Антитела 1-7F9 были введены примерно за 6 ч до инъекции клеток для индукции лизиса cw3 клеток-мишеней. Анти-NK1.1 антитело PK136 (BD Biosciences) вводили за 24 ч до инъекции клеток как контроль индукции уменьшения числа NK-клеток.

Результаты показаны на фиг. 1A, 1B и 2. На фиг. 1A и 1B представлено исследование процентного содержания CSFE-меченых клеток через 40 ч после инъекции клеток. Сходные результаты были получены для CSFE-меченых клеток через 20 ч после инъекции клеток. На фиг. 1A представлено резкое уменьшение процентного содержания CSFE-меченых клеток в PBMC в KIR2DL3tg B6 мышах, которым вводили антитела 1-7F9, по сравнению KIR2DL3tg B6 мышами, которым не вводили 1-7F9, и C57Bl6 мышами, которым вводили или не вводили 1-7F9. На фиг. 1B представлено резкое уменьшение процентного содержания CSFE-меченых клеток селезенки в селезенке KIR2DL3tg B6 мышей, которым вводили антитела

1-7F9, по сравнению KIR2DL3tg B6 мышами, которым не вводили 1-7F9, и C57Bl6 мышами, которым вводили или не вводили 1-7F9. На фиг. 2 рассмотрена относительная выживаемость CSFE-меченных клеток через 40 ч после инъекции клеток. На фиг. 2 рассмотрено резкое уменьшение выживаемости KbDb-/-cw3 ConA бластов в PBMC и селезенке в KIR2DL3tg B6 мышах, которым вводили антитела 1-7F9, по сравнению с KbDb KO cw3 tg мышами, которым не вводили антитело 1-7F9.

Известно, что NK-клетки обладают механизмами, обеспечивающими толерантность к собственным клеткам. См. Raulet and Vance (2006), Nature Immuno. Rev. 6:520-531. В частности, все NK-клетки экспрессируют ингибиторные молекулы KJR или ингибиторные молекулы CD94/NKG2A. Блокада рецепторов KJR по данным фазы I клинических исследований анти-KIR антител 1-7F9 в онкологии демонстрирует, что антитела не индуцируют воспаление или аутоиммунность в отличие от обычных моноклональных антител. Тем не менее пока нет данных по влиянию блокады KIR2DL1, 2 или 3 на устранение активированных или пролиферировавших Т-клеток in vivo. Настоящие результаты указывают, что KIR2DL3-экспрессирующие NK-клетки при блокировании KIR2DL3 способны in vivo уменьшать количество или элиминировать активированные Т-клетки, что в противном случае было бы блокировано их лигандом HLA-cw3. Следовательно, популяция клеток KIR2DL1, 2 и/или 3 обладает потенциалом к элиминации аутологичных активированных провоспалительных клеток при блокировании KIR in vivo.

Все ссылки, включая публикации, патентные заявки и патенты, цитированные здесь, включены в настоящий документ посредством ссылок во всей полноте в той же степени, как если бы каждая отдельная ссылка была конкретно отмечена как включенная посредством ссылки во всей полноте в настоящий документ (в максимальной степени, разрешенной законом), независимо от любого отдельно предусмотренного включения конкретных документов, сделанных в любом месте данного документа.

Если не указано иное, все точные значения, представленные здесь, являются репрезентативными для соответствующих приближенных значений (например, все точные примеры значений, приведенные в отношении конкретного фактора или измерения, необходимо рассматривать как приведение соответствующей приближенной оценки, обозначаемой термином "около").

Приведенное здесь описание любого аспекта или варианта изобретения с использованием таких терминов, как "содержащий", "имеющий", "включающий" со ссылкой на элемент или элементы, предназначено для указания также на сходные аспекты или варианты изобретения, которые "состоят из", "состоят по существу из" или "по существу состоят" из этого конкретного элемента или элементов, если прямо не указано иное или это явно не противоречит контексту (например, под композицией, описанной в данном документе как "включающей определенный элемент" следует понимать как также композицию, состоящую из этого элемента, если не прямо не указано иное или это явно не противоречит контексту).

Использование любых и всех примеров или указание на то, что элемент является примером (например, терминов "например", "такой как"), представленное в настоящем документе, предназначено исключительно для лучшего понимания изобретения и не накладывает ограничений на объем изобретения, если прямо не заявлено иное. Ни одно указание в описании не следует толковать как указание на существенность любого элемента, не включенного в формулу изобретения, для практического применения изобретения.

Все публикации, патенты и патентные заявки включены в настоящий документ посредством ссылок во всей полноте в той же степени, как если бы каждая отдельная ссылка была конкретно отмечена как включенная посредством ссылки во всей полноте в настоящий документ.

Специалисты в данной области предвидят или будут способны осуществить с использованием не более чем обычного экспериментирования многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных здесь. Такие эквиваленты входят в объем притязаний следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое потенцирует цитотоксическую активность и тем самым активирует натуральные клетки киллеры (NK-клетки) путем блокирования или нейтрализации ингибирования NK-клеток, опосредуемого экспрессированным на NK-клетках полипептидом KIR2DL1, KIR2DL2 и/или KIR2DL3 для лечения аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания, где аутоиммунные заболевания или воспалительное заболевание опосредуются, по меньшей мере частично, Т-клетками, где активированные NK-клетки уничтожают или уменьшают количество Т-клеток, вовлеченных в опосредуемое воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание, и где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(i) область V_L содержащую CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 24-34 из SEQ ID NO: 1; CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 50-56 из SEQ ID NO: 1; и CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 89-97 из SEQ ID NO: 1; и область V_H содержащую CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 31-35 из SEQ ID NO: 2; CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 50-65 из SEQ ID NO: 2; и CDR3, имею-

щий аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 99-112 из SEQ ID NO: 2; или

(ii) область V_L содержащую CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 24-34 из SEQ ID NO: 3; CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 50-56 из SEQ ID NO: 3; и CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 89-97 из SEQ ID NO: 3; и область V_H содержащую CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 31-35 из SEQ ID NO: 4; CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 50-65 из SEQ ID NO: 4; и CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 99-112 из SEQ ID NO: 4.

2. Применение по п.1, где указанные Т-клетки выбраны из Т-клеток, включающих по меньшей мере одно из:

(i) провоспалительные, активированные и/или пролиферирующие Т-клетки, $CD4^+$ Т-клетки, проникающие в ткани Т-клетки и Т-клетки, экспрессирующие HLA-cw3 и/или HLA-cw4; или

(ii) циркулирующие Т-клетки, Т-клетки, содержащиеся в подверженных заболеванию или воспаленных тканях, проникшие в подверженные заболеванию ткани Т-клетки, Т-клетки, содержащиеся в синовиальной ткани сустава или синовиальной жидкости, и Т-клетки, находящиеся в центральной нервной системе, прямой кишке или дерме.

3. Применение по п.1, где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, включающей острый синусит, хронический синусит, болезнь Аддисона, аутоиммунный гепатит, болезнь Бехчета, глютеновую энтеропатию, хронический активный гепатит, контактный дерматит, болезнь Крона, дерматомиозит, экземы, синдром Гудпасчера, синдром Гийена-Барре, энцефалит Хашимото, тиреоидит Хашимото, сахарный диабет I типа, красную волчанку, рассеянный склероз (РС), спинно-оптический РС, опсоклонус миоклонус синдром (OMS), паранеопластическую дегенерацию мозжечка, злокачественную анемию, полимиозит, первичный билиарный цирроз, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, височный артериит/гигантоклеточный артериит и язвенный колит.

4. Применение по п.1, где воспалительное заболевание, необязательно установленное воспалительное заболевание, выбрано из группы, включающей ревматоидный артрит, остеоартрит, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, реактивный артрит, синдром Рейтера, подагру, псевдоподагру, расстройство осаждения пирофосфата кальция, рассеянный склероз, болезнь Лайма, ревматическую полимиалгию, системную красную волчанку, системный склероз, полиомиозит, дерматомиозит, синдром Шегрена, нодозный полиартериит, гранулематоз Вегенера, синдром Черга-Штраусса, атеросклеротическую болезнь сосудов, атеросклероз, окклюзионные болезни сосудов, ишемическую болезнь сердца, рестеноз в стенте сосудов, увеит, заболевания роговицы, ирит, иридоциклит, целиакию, колит, болезнь Крона, экзему, фибромиалгию, гломерулонефрит, интерстициальный цистит, полиартериит, полихондрит, псориаз, саркоидоз, склеродермию и васкулит.

5. Применение по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент является химерным, гуманизированным, антиидиотипическим, одноцепочечным, бифункциональным или ко-специфическим.

6. Применение по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) последовательность, изложенную в п.1, подпункте (i), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

(ii) последовательность, изложенную в п.1, подпункте (ii), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, где необязательно

(a) остатки в положениях 3, 4, 9, 24, 32, 41, 47, 50, 55, 71 и 74 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 представляют собой Q, L, S, R, A, G, L, D, E, F и A соответственно или

(b) остатки 3, 4, 9, 24, 32, 41, 47, 50, 55, 71 и 74 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 представляют собой R, M, F, W, Y, A, F, Y, Q, Y и T соответственно;

(iii) последовательность, изложенную в п.1, подпункте (i), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;

(iv) последовательность, изложенную в п.1, подпункте (i), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2;

(v) последовательность, изложенную в п.1, подпункте (ii), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4;

(vi) последовательность, изложенную в п.1, подпункте (i), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6;

(vii) последовательность, изложенную в п.1, подпункте (i), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 2;

(viii) последовательность, изложенную в п.1, подпункте (i), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; или

(ix) последовательность, изложенную в п.1, подпункте (i), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

7. Применение по любому из пп.1-6, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент напрямую или не напрямую конъюгировано с меткой, цитотоксическим агентом, терапевтическим агентом или иммуносупрессирующим агентом,

где указанная метка представляет собой хемилюминесцентную метку, парамагнитную метку, контрастный агент для МРТ, флуоресцентную метку, биолюминесцентную метку или радиоактивную метку, где дополнительно указанная парамагнитная метка представляет собой алюминий, марганец, платину, кислород, лантан, лютеций, скандий, иттрий или галлий; и

где цитотоксический агент представляет собой компонент, который ингибирует синтез ДНК, РНК или белка, радионуклид или белок, ингибирующий работу рибосом, выбранный из ^{212}Bi, ^{131}I, ^{188}Re, виндезина, метотрексата, адриамицина, цисплатина, противовирусного белка лаконоса, экзотоксина А пвсевдомонад (Pseudomonas), рицина, дифтерийного токсина, цепи А рицина или цитотоксического фермента фосфолипазы.

8. Применение по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент:

(i) нейтрализует опосредуемое KIR2DL1, KIR2DL2 и/или KIR2DL3 ингибирование цитотоксичности NK-клеток;

(ii) обладает аффинностью к KIR2DL1, KIR2DL2 и/или KIR2DL3 по меньшей мере от около 10^4 до около 10^{10} M^{-1}, предпочтительно по меньшей мере от около 10^7 до около 10^9 M^{-1};

(iii) связывается с KIR2DL1, KIR2DL2 и/или KIR2DL3 с константой диссоциации менее чем около 100 нМ;

(iv) вводят в виде монотерапии или

(v) вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом, необязательно выбранным из (a) агента, уменьшающего воспаление; (b) низкомолекулярного соединения; (c) DMARD, предпочтительно анти-TNF-альфа антитела, низкомолекулярного ингибитора тирозинкиназы или метотрексата (MTX); и (d) агента, отличающегося от антитела IgG1 или IgG3 изотипа.

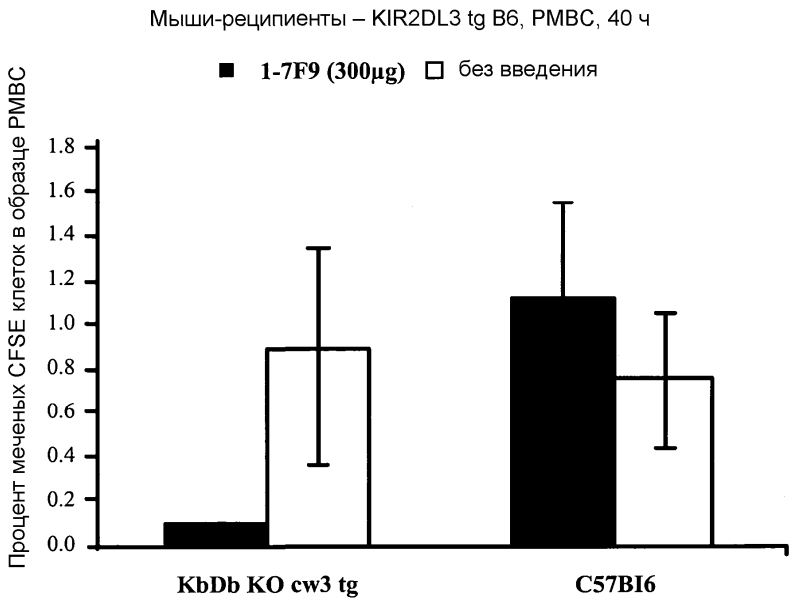
9. Применение по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в фармацевтически приемлемой композиции, включающей эффективное количество анти-KIR2DL1, KIR2DL2 и/или KIR2DL3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где необязательно отсутствуют любые другие фармацевтически активные агенты.

10. Применение по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

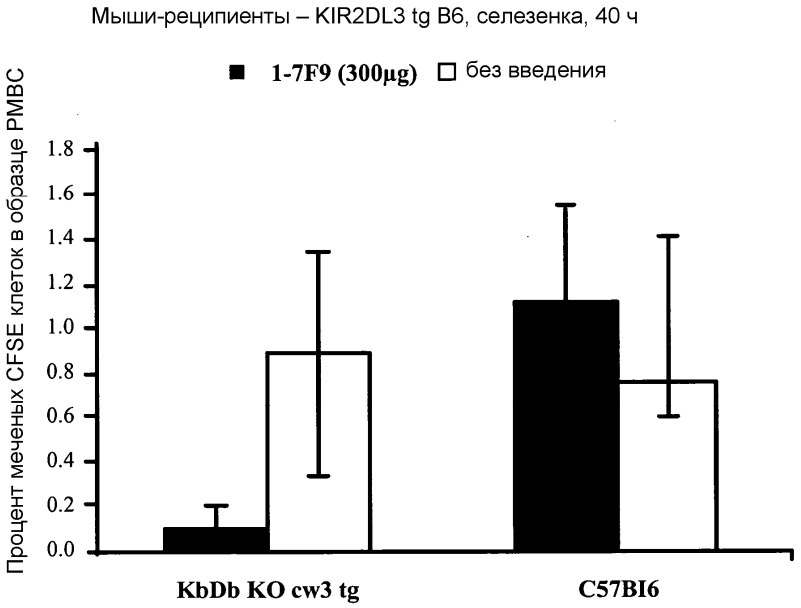
(i) предназначен для введения в количестве, приводящем к почти полному насыщению KIR2DL1, KIR2DL2 и/или KIR2DL3 на NK-клетках в течение по меньшей мере одной недели, по меньшей мере двух недель или по меньшей мере одного месяца; и/или

(ii) предназначен для введения несколько раз с частотой дозирования один раз в две недели, один раз в месяц, или один раз каждые два месяца, или в период времени более двух месяцев.

11. Применение по любому из пп.1-10, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG2 или антитело IgG4.

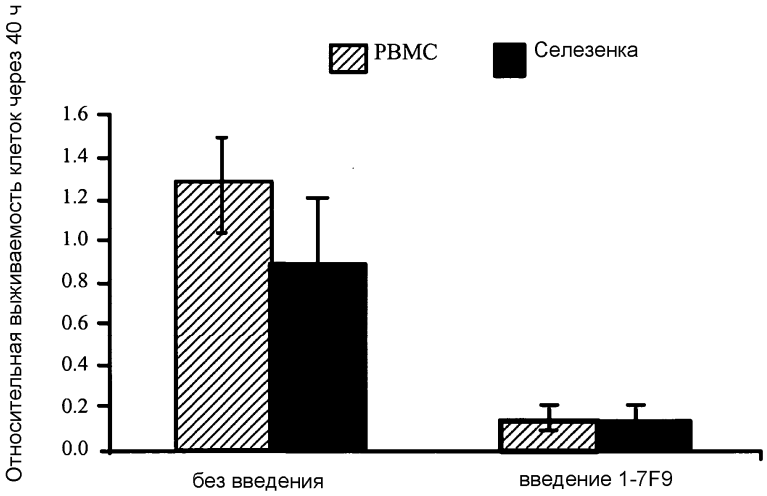

Мыши-реципиенты – KIR2DL3 tg B6, PMBC, 40 ч
1-7F9 (300μg)
без введения
Процент меченых CFSE клеток в образце PMBC
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
KbDb KO cw3 tg
C57BI6

Фиг. 1A


Мыши-реципиенты – KIR2DL3 tg B6, селезенка, 40 ч
1-7F9 (300μg)
без введения
Процент меченых CFSE клеток в образце PMBC
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
KbDb KO cw3 tg
C57BI6

Фиг. 1B

Отторжение KbDb -/- cw3 ConA бластов в KIR2DL3 tg B6 мышах, которым вводили 300 мкг моноклонального антитела 1-7F9



Фиг. 2