



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102548573 B

(45) 授权公告日 2016.03.16

(21) 申请号 201080034480.3

A61P 3/10(2006.01)

(22) 申请日 2010.08.16

A61P 3/00(2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 9/00(2006.01)

61/234,425 2009.08.17 US

A61P 29/00(2006.01)

61/304,113 2010.02.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2012.01.29

US 2005/0158307 A1, 2005.07.21, 权利要求 1-7, 说明书第 26-27, 91-92, 114-118 页.

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 1984672 A, 2007.06.20, 权利要求 1-26

PCT/US2010/045627 2010.08.16

及说明书 2-3, 27-34, 37-38.

(87) PCT国际申请的公布数据

WO 2008/014035 A2, 2008.01.31, 权利要求

W02011/022334 EN 2011.02.24

1-6, 实施例 3-11.

(73) 专利权人 宾州研究基金会

CN 1984672 A, 2007.06.20, 权利要求 1-26

地址 美国宾夕法尼亚州

及说明书 2-3, 27-34, 37-38.

专利权人 加利福尼亚大学董事会

审查员 刘东吉

(72) 发明人 熊那 夏明灿 D·H·罗莱

J·S·彼得森

T·B·博德瓦尔斯多坦

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 杨帆

(51) Int. Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

权利要求书1页 说明书38页

序列表20页 附图15页

(54) 发明名称

NKG2D 抑制剂在治疗心血管和代谢疾病如 2 型糖尿病中的用途

(57) 摘要

本发明提供治疗和检测 2 型糖尿病和 / 或可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症如心血管病的方法、组合物和药盒 / 试剂盒。

1. 治疗有效量的特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段在制备治疗对象的 2 型糖尿病的药物中的用途。
2. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在於,所述对象是人。
3. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在於,所述抗体或其抗原结合片段是人或人源化的。
4. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在於,所述抗体或其抗原结合片段结合人 NKG2D。
5. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在於,所述抗体或其抗原结合片段降低 NKG2D 介导的 NKG2D 表达细胞的激活或信号转导。
6. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在於,所述抗体或其抗原结合片段与至少一种 NKG2D 配体竞争结合 NKG2D。
7. 如权利要求 6 所述的用途,其特征在於,所述 NKG2D 配体是 MICA/B。
8. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在於,所述药物给予导致所述对象出现下述反应中至少一种:血糖水平降低、葡萄糖耐受提高、胰岛素抗性降低、体重降低、血压降低、炎症减轻或代谢功能障碍减轻。
9. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在於,所述药物经静脉内、腹膜内或皮下途径给予。

NKG2D 抑制剂在治疗心血管和代谢疾病如 2 型糖尿病中的用途

[0001] 联邦资助的研究

[0002] 本发明是在美国农业部授权号 PEN04143 和国立卫生研究院 (NIH) 授权号 CA093678 下由政府支持进行。政府对本发明拥有某些权利。

[0003] 相关申请的引用

[0004] 本申请根据美国专利法条款 119(e) (35U. S. C. § 119(e)) 要求 2009 年 8 月 17 日提交的美国临时专利申请第 61/234, 425 号和 2010 年 2 月 12 日提交的美国临时专利申请第 61/304, 113 号的优先权, 其通过引用全文纳入本文。

技术领域

[0005] 本发明涉及治疗 2 型糖尿病和 / 或可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症如心血管病的方法。

[0006] 发明背景

[0007] 深受糖尿病困扰的人群数量大且不断增加。糖尿病是胰腺激素胰岛素相对或绝对缺陷引起的血糖水平升高导致的代谢疾病。胰岛素响应血糖水平而由胰腺分泌到血液中, 其主要功能是将血糖导入机体储备, 从而控制血糖水平。

[0008] 已知糖尿病分为 1 型和 2 型。1 型糖尿病的特征是靶向 β 细胞的破坏性自身免疫过程和这些细胞的再生能力之间失衡所致的胰腺 β 细胞进行性损失。这种失衡最终导致完全丧失 β 细胞和内源性胰岛素分泌。1 型糖尿病占糖尿病总数的 5-10%。2 型糖尿病的特征是胰岛素抗性和 β 细胞功能受损, 包括第一期胰岛素释放受损、 β 细胞脉冲质量降低和胰岛素缺陷。2 型糖尿病是最常见的糖尿病形式, 占糖尿病总数的 90-95%。

[0009] 糖尿病患者发生心血管病的概率是未患糖尿病的人群的 2-4 倍。尽管在过去几十年治疗取得很大进步, 但心血管病仍然是 2 型糖尿病患者的主要并发症 和主要致死原因。心脏病发作、中风和下肢截肢的风险增加是糖尿病患者过早死亡的主要原因。在 2 型糖尿病患者中, 包括肥胖、高血压、血脂异常和缺乏运动在内的心血管病风险因素通常更为普遍。

[0010] 心血管病是最严重的人类健康问题并且是美国的第一大死亡原因。根据美国心脏协会的报道, 单单在美国, 2008 年心血管病预防和治疗的花费将达到令人惊讶的 4485 亿美元, 形成巨大的社会财政负担。动脉粥样硬化是动脉血管内壁上形成由脂肪物质和细胞组分构成的斑块的心血管病形式。该疾病由功能障碍性代谢疾病, 如糖尿病患者动脉的易患区域上沉积异常代谢物引发, 并且随着包括免疫激活和炎症在内多种因素的卷入而不断进展。

[0011] 异常代谢疾病如糖尿病引发多种细胞应激反应, 诱导组织炎症和免疫细胞激活, 进而加重代谢功能障碍, 产生恶性循环持续造成诸如心血管病进展等失调的下游后果。然而, 我们尚未彻底了解联接这些过程的分子事件, 这阻碍了我们通过调节免疫系统治疗代谢功能障碍和心血管病并发症的努力。

[0012] 因此,需要有效的方法来预测、预防和治疗代谢功能障碍相关疾病,如糖尿病以及心血管疾病和失调。

发明内容

[0013] 本发明涉及在患有 2 型糖尿病和 / 或代谢功能障碍的患者和动物中上调,和可能对血管和肝脏炎症、代谢功能障碍和心血管病发生中的免疫细胞激活起到重要作用的免疫刺激分子家族的发现。具体说,在 2 型糖尿病患者以及脂质代谢功能障碍和动脉粥样硬化的动物模型中检测到 NKG2D(一种强效免疫激活受体)的刺激配体水平升高。

[0014] 因此,本发明提供治疗 2 型糖尿病和可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症如心血管病的新方法、组合物和药盒。本发明也提供检测和诊断 2 型糖尿病或心血管病发生倾向或者 2 型糖尿病或心血管病的存在的新方法。

[0015] 在一个实施方式中,本发明提供一种治疗 2 型糖尿病的方法,所述方法包括给予需要的对象治疗有效量的抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂。在另一实施方式中,本发明提供一种治疗 2 型糖尿病的方法,所述方法包括给予需要的对象治疗有效量的阻断 NKG2D 配体结合作用的药剂。在另一实施方式中,本发明提供一种治疗可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症的方法,所述方法包括给予需要的对象治疗有效量的抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂,其中所述病症选自 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和代谢功能障碍相关疾病。在另一实施方式中,本发明提供一种治疗可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症的方法,所述方法包括给予需要的对象治疗有效量的阻断 NKG2D 配体结合作用的药剂,其中所述病症选自 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和代谢功能障碍相关疾病。

[0016] 在另一实施方式中,本发明涉及治疗有效量的在对象中抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂在治疗 2 型糖尿病中的用途。在另一实施方式中,本发明涉及治疗有效量的在对象中阻断 NKG2D 配体结合作用的药剂在治疗 2 型糖尿病中的用途。在另一实施方式中,本发明涉及治疗有效量的在对象中抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂在治疗可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症中的用途,其中所述病症选自 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和代谢功能障碍相关疾病。在另一实施方式中,本发明涉及治疗有效量的在对象中阻断 NKG2D 配体结合作用的药剂在治疗可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症中的用途,其中所述病症选自 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和代谢功能障碍相关疾病。

[0017] 在一些实施方式中,可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症是 2 型糖尿病。在一些实施方式中,所述病症是心血管病。

[0018] 在一些实施方式中,所述对象是人。

[0019] 在一些实施方式中,所述药剂选自可溶性 NKG2D、特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段、NKG2D 配体和 NKG2D 配体活性或表达的抑制剂。在一些实施方式中,所述药剂是特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段是人或人源化的。在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段结合人 NKG2D(hNKG2D)。在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段降低 NKG2D 介导的 NKG2D 表达细胞的激活或信号转导。在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段与至少一种 NKG2D 配体竞争结合 NKG2D。在一些实施方式中,所述 NKG2D 配体是 MICA/B。

[0020] 在一些实施方式中,给予所述药剂导致对象出现下述反应中至少一种:血糖水平

降低、葡萄糖耐受提高、胰岛素抗性降低、体重降低、血压降低、炎症减轻或代谢功能障碍减轻。

[0021] 在一些实施方式中,通过静脉内、腹膜内或皮下途径给予所述药剂。

[0022] 在一些实施方式中,本发明方法还包括至少一种选自下组的额外药剂:抗糖尿病药、抗肥胖药、食欲调节药、抗高血压药、治疗和 / 或预防糖尿病导致或与糖尿病相关的并发症的药剂、和治疗和 / 或预防肥胖导致或与肥胖相关的并发症和失调的药剂。在一些实施方式中,所述额外药剂选自 (a) 选自下组的降血糖药:GLP-1 和 GLP-1 衍生物和类似物、重组促胰岛素分泌肽 (Exendin)-4 和重组促胰岛素分泌肽 -4 衍生物和类似物、糊精和糊精衍生物和类似物、磺脲、双胍、氯茴苯酸 (如那格列奈和瑞格列奈)、葡糖苷酶抑制剂、DPP-IV(二肽基肽酶 -IV) 抑制剂、SGLT2 抑制剂、SGLT1 抑制剂或激动剂、胃泌素和胃泌素类似物和衍生物、FGF-21(成纤维细胞生长因子 21) 和 FGF-21 衍生物和类似物、质子泵抑制剂如兰索拉唑、奥美拉唑、右旋兰索拉唑、艾美拉唑、泮托拉唑和雷贝拉唑、RXR 激动剂、考来烯胺、考来替泊、普罗布考、右旋甲状腺素、PPAR 激动剂、脂连蛋白和脂连蛋白衍生物和类似物;(b) 选自下组的降血脂剂或脂质代谢调节剂:抗高血脂药,HMG CoA 抑制剂(他汀类)如洛伐他汀、帕伐他汀和斯伐他汀,以及贝特类药物如吉非贝齐和氯贝丁酯;(c) 选自下组的降低食物摄入或提高能量消耗的药剂:NPY(神经肽 Y)拮抗剂、PYY(多肽 YY)激动剂、PP(胰多肽)激动剂、Y2 受体激动剂、Y4 受体激动剂、混合的 Y2/Y4 受体激动剂、MC4(黑皮质素 4)激动剂、阿立新拮抗剂、胰高血糖素和胰高血糖素衍生物和类似物、CRF(促肾上腺皮质激素释放因子)激动剂、CRF BP(促肾上腺皮质激素释放因子结合蛋白)拮抗剂、尿皮质素激动剂、 β 3 激动剂、MSH(促黑色素细胞激素)激动剂、MCH(黑色素细胞聚集激素)拮抗剂、CCK(胆囊收缩素)激动剂、血清素再摄取抑制剂、血清素和去甲肾上腺素再摄取抑制剂、混合的血清素和去甲肾上腺素能化合物、5HT(血清素)激动剂、铃蟾肽激动剂、甘丙肽拮抗剂、生长激素、生长激素释放化合物、TRH(促甲状腺激素释放激素)激动剂、UCP 2 或 3(非偶联的蛋白质 2 或 3)调节剂、瘦激素激动剂、DA 激动剂(溴隐亭、多普辛(doprexin))、脂肪酶 / 淀粉酶抑制剂、RXR(类视黄醇 X 受体)调节剂、组胺 H3 拮抗剂和 CART(可卡因安非他明调节的转录物)激动剂;和 (d) 选自下组的降血压药: β -阻断剂如阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔和美托洛尔,ACE(血管紧张素转化酶)抑制剂如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、阿拉普利(alatriopril)、喹那普利和雷米普利,钙通道阻断剂如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔硫卓和维拉帕米,以及 α -阻断剂如多沙唑嗪、乌拉地尔、哌唑嗪和特拉唑嗪。

[0023] 在一个实施方式中,本发明提供一种组合物,其包含治疗有效量的抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂和药学上可接受的运载体。在另一实施方式中,本发明提供一种组合物,其包含治疗有效量的阻断 NKG2D 配体结合作用的药剂和药学上可接受的运载体。

[0024] 在一些实施方式中,所述药剂可用于治疗 2 型糖尿病。在一些实施方式中,所述药剂用于治疗可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症。

[0025] 在一些实施方式中,所述病症选自 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和代谢功能障碍相关疾病。在一些实施方式中,所述病症是 2 型糖尿病。在一些实施方式中,所述病症是心血管病。

[0026] 在一些实施方式中,所述药剂选自可溶性 NKG2D、特异性结合 NKG2D 的抗体或其

抗原结合片段、NKG2D 配体和 NKG2D 配体活性或表达的抑制剂。在一些实施方式中,所述药剂是特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段是人或人源化的。在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段结合人 NKG2D (hNKG2D)。

[0027] 在一些实施方式中,所述药剂是 NKG2D 配体活性或表达的抑制剂。在一些实施方式中,所述 NKG2D 配体活性或表达的抑制剂是 MICA/B 抑制剂。在一些实施方式中,所述 MICA/B 抑制剂是 MICA/B- 特异性 siRNA。

[0028] 在一些实施方式中,本发明组合物还包含至少一种选自下组的额外药剂:抗糖尿病药、抗肥胖药、食欲调节药、抗高血压药、治疗和 / 或预防糖尿病导致或与糖尿病相关的并发症的药剂、和治疗和 / 或预防肥胖导致或与肥胖相关的并发症和失调的药剂。在一些实施方式中,所述额外药剂选自 (a) 选自下组的降血糖药:GLP-1 和 GLP-1 衍生物和类似物、重组促胰岛素分泌肽 (Exendin)-4 和重组促胰岛素分泌肽 -4 衍生物和类似物、糊精和糊精衍生物和类似物、磺脲、双胍、氯茴苯酸 (如那格列奈和瑞格列奈)、葡糖苷酶抑制剂、DPP-IV (二肽基肽酶 -IV) 抑制剂、SGLT2 抑制剂、SGLT1 抑制剂或激动剂、胃泌素和胃泌素类似物和衍生物、FGF-21 (成纤维细胞生长因子 21) 和 FGF-21 衍生物和类似物、质子泵抑制剂如兰索拉唑、奥美拉唑、右旋兰索拉唑、艾美拉唑、泮托拉唑和雷贝拉唑、RXR 激动剂、考来烯胺、考来替泊、普罗布考、右旋甲状腺素、PPAR 激动剂、脂连蛋白和脂连蛋白衍生物和类似物;(b) 选自下组的降血脂剂或脂质代谢调节剂:抗高血脂药,HMG CoA 抑制剂 (他汀类) 如洛伐他汀、帕伐他汀和斯伐他汀,以及贝特类药物如吉非贝齐和氯贝丁酯;(c) 选自下组的降低食物摄入或提高能量消耗的药剂:NPY (神经肽 Y) 拮抗剂、PYY (多肽 YY) 激动剂、PP (胰多肽) 激动剂、Y2 受体激动剂、Y4 受体激动剂、混合的 Y2/Y4 受体激动剂、MC4 (黑皮质素 4) 激动剂、阿立新拮抗剂、胰高血糖素和胰高血糖素衍生物和类似物、CRF (促肾上腺皮质激素释放因子) 激动剂、CRF BP (促肾上腺皮质激素释放因子结合蛋白) 拮抗剂、尿皮质素激动剂、 β 3 激动剂、MSH (促黑色素细胞激素) 激动剂、MCH (黑色素细胞聚集激素) 拮抗剂、CCK (胆囊收缩素) 激动剂、血清素再摄取抑制剂、血清素和去甲肾上腺素再摄取抑制剂、混合的血清素和去甲肾上腺素能化合物、5HT (血清素) 激动剂、铃蟾肽激动剂、甘丙肽拮抗剂、生长激素、生长激素释放化合物、TRH (促甲状腺激素释放激素) 激动剂、UCP 2 或 3 (非偶联的蛋白质 2 或 3) 调节剂、瘦激素激动剂、DA 激动剂 (溴隐亭、多普辛 (doprexin))、脂肪酶 / 淀粉酶抑制剂、RXR (类视黄醇 X 受体) 调节剂、组胺 H3 拮抗剂和 CART (可卡因安非他明调节的转录物) 激动剂;和 (d) 选自下组的降血压药: β - 阻断剂如阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔和美托洛尔, ACE (血管紧张素转化酶) 抑制剂如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、阿拉普利 (alatriopril)、喹那普利和雷米普利,钙通道阻断剂如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔硫卓和维拉帕米,以及 α - 阻断剂如多沙唑啉、乌拉地尔、哌唑啉和特拉唑啉。

[0029] 在一个实施方式中,本发明提供一种药盒,其包含:(a) 治疗有效量的抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂以及药学上可接受的运载体;和 (b) 使用说明书。在另一实施方式中,本发明提供一种药盒,其包含:(a) 治疗有效量的阻断 NKG2D 配体结合作用的药剂以及药学上可接受的运载体;和 (b) 使用说明书。

[0030] 在一些实施方式中,所述药剂可用于治疗 2 型糖尿病。

[0031] 在一些实施方式中,所述药剂用于治疗可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症。

[0032] 在一些实施方式中,所述病症选自 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和代谢功能障碍相关疾病。在一些实施方式中,所述病症是 2 型糖尿病。在一些实施方式中,所述病症是心血管病。

[0033] 在一些实施方式中,所述药剂选自可溶性 NKG2D、特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段、NKG2D 配体和 NKG2D 配体活性或表达的抑制剂。在一些实施方式中,所述药剂是特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段是人或人源化的。在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段结合人 NKG2D (hNKG2D)。

[0034] 在一些实施方式中,本发明药盒还包括至少一种选自下组的额外药剂:抗糖尿病药、抗肥胖药、食欲调节药、抗高血压药、治疗和 / 或预防糖尿病导致或与糖尿病相关的并发症的药剂、和治疗和 / 或预防肥胖导致或与肥胖相关的并发症和失调的药剂。在一些实施方式中,所述额外药剂选自 (a) 选自下组的降血糖药:GLP-1 和 GLP-1 衍生物和类似物、重组促胰岛素分泌肽 (Exendin)-4 和重组促胰岛素分泌肽 -4 衍生物和类似物、糊精和糊精衍生物和类似物、磺脲、双胍、氯茴苯酸 (如那格列奈和瑞格列奈)、葡糖苷酶抑制剂、DPP-IV (二肽基肽酶 -IV) 抑制剂、SGLT2 抑制剂、SGLT1 抑制剂或激动剂、胃泌素和胃泌素类似物和衍生物、FGF-21 (成纤维细胞生长因子 21) 和 FGF-21 衍生物和类似物、质子泵抑制剂如兰索拉唑、奥美拉唑、右旋兰索拉唑、艾美拉唑、泮托拉唑和雷贝拉唑、RXR 激动剂、考来烯胺、考来替泊、普罗布考、右旋甲状腺素、PPAR 激动剂、脂连蛋白和脂连蛋白衍生物和类似物; (b) 选自下组的降血脂剂或脂质代谢调节剂:抗高血脂药,HMG CoA 抑制剂 (他汀类) 如洛伐他汀、帕伐他汀和斯伐他汀,以及贝特类药物如吉非贝齐和氯贝丁酯; (c) 选自下组的降低食物摄入或提高能量消耗的药剂:NPY (神经肽 Y) 拮抗剂、PYY (多肽 YY) 激动剂、PP (胰多肽) 激动剂、Y2 受体激动剂、Y4 受体激动剂、混合的 Y2/Y4 受体激动剂、MC4 (黑皮质素 4) 激动剂、阿立新拮抗剂、胰高血糖素和胰高血糖素衍生物和类似物、CRF (促肾上腺皮质激素释放因子) 激动剂、CRF BP (促肾上腺皮质激素释放因子结合蛋白) 拮抗剂、尿皮质素激动剂、 β 3 激动剂、MSH (促黑色素细胞激素) 激动剂、MCH (黑色素细胞聚集激素) 拮抗剂、CCK (胆囊收缩素) 激动剂、血清素再摄取抑制剂、血清素和去甲肾上腺素再摄取抑制剂、混合的血清素和去甲肾上腺素能化合物、5HT (血清素) 激动剂、铃蟾肽激动剂、甘丙肽拮抗剂、生长激素、生长激素释放化合物、TRH (促甲状腺激素释放激素) 激动剂、UCP 2 或 3 (非偶联的蛋白质 2 或 3) 调节剂、瘦激素激动剂、DA 激动剂 (溴隐亭、多普辛 (doprexin))、脂肪酶 / 淀粉酶抑制剂、RXR (类视黄醇 X 受体) 调节剂、组胺 H3 拮抗剂和 CART (可卡因安非他明调节的转录物) 激动剂; 和 (d) 选自下组的降血压药: β -阻断剂如阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吡洛洛尔、普萘洛尔和美托洛尔, ACE (血管紧张素转化酶) 抑制剂如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、阿拉普利 (alatriopril)、喹那普利和雷米普利, 钙通道阻断剂如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔硫卓和维拉帕米, 以及 α -阻断剂如多沙唑嗪、乌拉地尔、哌唑嗪和特拉唑嗪。

[0035] 在一个实施方式中,本发明提供一种在对象中检测 2 型糖尿病发生倾向或 2 型糖尿病的存在的方法,所述方法包括:(a) 由所述对象获得样品;(b) 将所述样品与检测是否

存在 MICA/B 表达的至少一种试剂相接触 ;(c) 测定所述样品中的 MICA/B 表达水平 ;和 (d) 将 MICA/B 过度表达与所述对象的 2 型糖尿病发生倾向或存在 2 型糖尿病相关联。在另一实施方式中,本发明提供一种在对象中检测心血管病发生倾向或心血管病的存在的方法,所述方法包括:(a) 由所述对象获得样品 ;(b) 将所述样品与检测是否存在 MICA/B 表达的至少一种试剂相接触 ;(c) 测定所述样品中的 MICA/B 表达水平 ;和 (d) 将 MICA/B 过度表达与所述对象的心血管病发生倾向或存在心血管病相关联。

[0036] 在一些实施方式中,所述试剂是 MICA/B 抗体。

[0037] 在一些实施方式中,所述样品是血清。

[0038] 在一些实施方式中,所述对象是人。

[0039] 在一些实施方式中,本发明方法还包括测定所述样品中不是 MICA/B 的心血管病标记物的表达水平,并将心血管病标记物的过度表达或表达不足与所述对象的心血管病发生倾向或存在心血管病相关联。

[0040] 附图简要说明

[0041] 图 1 是显示在 2 型糖尿病患者血清中检测的可溶性 MICA 蛋白和其与其他促炎细胞因子表达的相关性的一系列图。(A) 检测 2 型糖尿病患者血液中的可溶性 MICA。利用 ELISA 试剂盒(明尼苏达州明尼阿波利斯的 R&D 系统公司(R&D Systems, Minneapolis, MN)) 测定糖尿病患者血清中的 MICA 蛋白。重组 MICA 蛋白用作标准品,根据它计算血清 MICA 水平。X 轴的每个数字代表一位患者。(B 和 C) 通过人促炎 4 重组(IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和 IFN- γ)(马里兰州盖瑟斯堡的美索发现公司(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)) 分析同一患者血清中的 IL-6 和 TNF- α 水平。(D) 通过 CRP ELISA 试剂盒(加州春谷的凯尔生物技术公司(Calbiotech Inc. Spring Valley, CA)) 分析 2 型糖尿病患者血清中的 C-反应性蛋白(CRP)的血清水平。(E) 平均来看,糖尿病患者的血清 MICA 水平高于所检测的 50 位癌症患者。将 2 型糖尿病患者的数据分组,并与 50 位癌症患者的数据作比较。

[0042] 图 2 是一系列冰冻切片的显微照片,显示通过免疫组化染色在人主动脉斑块上检测到 MICA/B。用抗 -MICA/B 抗体对斑块的冰冻切片染色(A、C、E、G)。用抗 -Mac-3 或 CD31 抗体对相邻切片进行染色,以显示巨噬细胞或内皮细胞(B、D、F、H)。正常主动脉的切片用作 MICA 染色对照(I)。

[0043] 图 3 是一系列电泳凝胶照片和一系列免疫组化染色的冰冻切片照片,显示在 ApoE-/- 小鼠的动脉粥样硬化斑块中 NKG2D 配体上调。(A) 对主动脉斑块病变的 RNA 中 NKG2D 配体 Rae-1 δ 、Rae-1 ϵ 和 H60b 的转录物进行半定量 RT-PCR 分析。(B) 在饲喂西方饮食(WD)的 ApoE-/- 和年龄匹配的饲喂西方饮食的野生型小鼠和饲喂正常食物的野生型小鼠中,对分离自主动脉弓区域的 RNA 样品中的 Rae-1 δ 、Rae-1 ϵ 和 H60b 转录物进行实时 RT-PCR 分析。实验进行两次。(C) 对自然产生斑块的(右侧)或 STZ-诱导型糖尿病加速的(左侧) ApoE-/- 小鼠的斑块冰冻切片进行免疫组化染色。切片用抗 -Rae-1 或 H60 抗体(褐色)和抗 -CD68 抗体(蓝色)进行复染。(D) 免疫组化染色饲喂西方饮食的 ApoE-/- 小鼠动脉粥样硬化主动脉中的 NKG2D 配体 Rae-1 和 H60。同一饲喂西方饮食的 ApoE-/- 小鼠的动脉粥样硬化主动脉弓区域(上图和中图)和“无斑块”胸部区域(下图)的冰冻切片用多克隆山羊抗 -小鼠抗 -Rae-1(R&D 系统公司)或 H60 抗体(圣克鲁兹生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology))进行染色。中部照片为上图(100X)中方框区域的高倍放

大图 (400X)。(E) 流式细胞术分析分离自 ApoE^{-/-} 小鼠的动脉粥样硬化主动脉或野生型小鼠的正常主动脉的巨噬细胞和内皮细胞上的细胞表面 Rae-1 表达。在 CD45⁺CD11b⁺CD16/32⁺ 细胞群上选巨噬细胞, CD45⁺CD31⁺ 细胞群上选内皮细胞。灰色区域是同种型匹配的对照抗体染色。(F) 对体外处理的野生型巨噬细胞中的总 Rae-1 蛋白进行蛋白质印迹分析。(G) 对仅在培养基中和在额外 oxLDL、天然 LDL(nLDL) 和 LPS(作为对照) 存在下培养的野生型巨噬细胞中的不同 NKG2D 配体上调进行半定量 RT-PCR 分析。(H) 对氧化 LDL(oxLDL) 或晚期糖基化终产物 (AGE) 存在下体外培养的野生型巨噬细胞上的 Rae-1 表达进行流式细胞术分析。巨噬细胞分离自腹腔,并在含 5 μg/ml oxLDL 或 200 μg/ml AGE 的培养基中体外培养 2 天,然后通过类似于图 E 的流式细胞术进行分析,不同之处在于虚线代表在 10 倍过量的未标记的抗-泛 Rae-1 抗体存在下染色。

[0044] 图 4 是 ApoE 缺失小鼠的主动脉的一系列照片,显示在有糖尿病的 ApoE 缺失小鼠中抗-NKG2D 抗体抑制斑块形成。(A) 代表性抗-NKG2D 或对照抗体处理的患有糖尿病的 ApoE 缺失小鼠的主动脉中的斑块形成。主动脉用 PBS 灌注,并在解剖显微镜下观察明显的不透明斑块。需要注意的是,在抗-NKG2D 抗体治疗小鼠中斑块显著缩小(圆圈区域)。(B) 对来自一个代表性实验的抗-NKG2D(MI-6) 和对照抗体(对照)处理的 ApoE^{-/-} 小鼠的主动脉中的沉积脂类物质进行正面油红 O(En face Oil red O) 染色。打开主动脉,用 10% 福尔马林固定,并用油红 O 染料染色。脂类物质染成深红色。需要注意的是,在抗-NKG2D 抗体处理小鼠的主动脉弓区域油红 O 染色明显较少。

[0045] 图 5 是表明在各种小鼠模型中靶向 NKG2D/ 配体相互作用能防止动脉粥样硬化的一系列图片。(A) 在链脲霉素诱导的糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠中抗-NKG2D 抗体阻断对动脉粥样硬化发生的影响。根据油红 O 阳性染色面积占总弓面积的比例计算对照和抗-NKG2D 处理的糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠的主动脉上的斑块大小。(B 和 C) 在链脲霉素诱导的患有糖尿病(B) 或饲喂西方饮食(C) 的 KLRK1^{-/-}ApoE^{-/-} 小鼠中(KLRK1 基因编码 NKG2D 蛋白),NKG2D 敲除对动脉粥样硬化发生的影响。斑块大小的计算方法与图 A 相同。ApoE^{-/-} 小鼠用作对照。

[0046] 图 6 是显示抗-NKG2D 抗体处理的患有糖尿病的 ApoE 缺失小鼠的血清中促炎细胞因子减少的一系列图片。用小鼠促炎-7 重试剂盒(IL-6、TNF-α、IFN-γ、IL-12p70、IL-10、IL-1β 和 KC/CXCL1)(马里兰州盖瑟斯堡的美索发现公司)直接分析四只抗-NKG2D(MI-6 Ab)-处理的和三只对照抗体(Con Ab)处理的糖尿病 ApoE 缺失小鼠以及年龄匹配的野生型 B6(野生型)各两只,一月龄(幼年 ApoE)或八月龄(老年 ApoE) ApoE^{-/-} 小鼠的血清。星号*表明抗-NKG2D 抗体和对照抗体处理的糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠之间的数值有统计学显著差异。

[0047] 图 7 是显示 KLRK1^{-/-}ApoE^{-/-} 小鼠(具有缺陷型 NKG2D 基因)的血清中促炎细胞因子减少的一系列图片。通过如图 6 所示的小鼠促炎-7 重试剂盒(IL-6、TNF-α、IFN-γ、IL-12p70、IL-10、IL-1β 和 KC/CXCL1)(马里兰州盖瑟斯堡的美索发现公司)直接分析饲喂西方饮食(12 只小鼠/组)(图 A)或 STZ 诱导型糖尿病(4 只小鼠/组)(图 B) KLRK1^{-/-}ApoE^{-/-} 和 ApoE^{-/-} 小鼠的血清。星号表明抗-NKG2D 抗体和对照抗体处理的糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠之间的数值有统计学显著差异(**p < 0.01 ; *p < 0.05)。

[0048] 图 8 是显示 KLRK1^{-/-}ApoE^{-/-} 小鼠的代谢疾病缓解的一对血清照片和一对图片。

(A) 饲喂西方饮食的 KLRK1^{-/-}ApoE^{-/-} 的血清比饲喂类似饮食的 ApoE^{-/-} 小鼠的血清表现更澄清。(B) KLRK1^{-/-}ApoE^{-/-} 小鼠血液中胆固醇和甘油三酯水平降低。分析图 A 中血清的总胆固醇和甘油三酯。星号 ** 表明 KLRK1/ApoE 双敲除和 ApoE^{-/-} 敲除小鼠之间的数值有统计学显著差异 (** $p < 0.05$)。每组使用至少 5 只小鼠。

[0049] 图 9 是显示 NKG2D^{-/-} 敲除 KLRK1^{-/-}ApoE^{-/-} 小鼠的血清丙氨酸转氨酶 (ALT) 活性相较 ApoE^{-/-} 小鼠降低的图片。每组使用至少 5 只小鼠。

[0050] 图 10 是显示防止 NKG2D/ 配体相互作用能减轻饲喂西方饮食的 ApoE^{-/-} 小鼠的肝脏炎症的一对图片。

[0051] (A) NKG2D^{-/-} 敲除 KLRK1^{-/-}ApoE^{-/-} 小鼠的离体培养的肝脏外植体的 IL-6 产量降低。从饲喂西方饮食的 ApoE^{-/-} 或 NKG2D^{-/-} 敲除 KLRK1^{-/-}ApoE^{-/-} 小鼠中切除 PBS- 灌注的肝脏。将相同重量的切除肝脏切成大约 1mm³ 的方块, 在培养基中培养 1 或 3 天。回收培养基, 通过 ELISA 分析细胞因子。该实验重复两次。(B) 在饲喂西方饮食的 NKG2D^{-/-} 敲除 KLRK1^{-/-}ApoE^{-/-} 小鼠的肝脏中, 免疫细胞浸润减少。数量是每个肝脏中每种免疫细胞类型的数量, 根据从肝脏中分离的总单核细胞和每种类型的百分数计算。每组使用至少 3 只小鼠。显示三次独立实验中的一次代表性实验。

[0052] 图 11 是一系列图片和荧光活化细胞分选分析图, 显示饲喂西方饮食的 ApoE^{-/-} 小鼠的肝脏细胞中 NKG2D 配体上调, 以及防止 NKG2D/ 配体相互作用能减少肝脏中表达 NKG2D 的免疫细胞的激活。(A) 对饲喂西方饮食 8 周的 12 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠和相同年龄的野生型小鼠的肝脏和其他器官中的 Rae-1 δ 转录物进行实时 RT-PCR 分析。(B) 对从饲喂西方饮食的 ApoE^{-/-} 小鼠和野生型小鼠的肝脏中纯化的巨噬细胞的 Rae-1 δ 转录物进行实时 RT-PCR 分析。(C 和 D) 对饲喂西方饮食的 ApoE^{-/-} 小鼠的肝脏巨噬细胞 (C) 和肝细胞 (D) 的 Rae-1 表达进行流式细胞术分析。(E) NKG2D^{-/-} 敲除 KLRK1^{-/-}ApoE^{-/-} 小鼠的肝脏 NKT 细胞的 IFN- γ 和 IL-4 产量降低。(F) 与 ApoE^{-/-} 小鼠相比, NKG2D^{-/-} 敲除 KLRK1^{-/-}ApoE^{-/-} 小鼠的肝脏 NK 细胞的 IFN- γ 产量较低。(G) NKG2D^{-/-} 敲除 KLRK1^{-/-}ApoE^{-/-} 和 ApoE^{-/-} 小鼠的肝脏巨噬细胞的 IL-6 产量没有差异。

[0053] 图 12 是显示靶向 NKG2D 会抑制 2 型糖尿病的图片。向 8 周龄的 ApoE^{-/-} 和 NKG2D 缺陷型 ApoE^{-/-}KLRK1^{-/-} 小鼠饲喂西方饮食 3 个月。然后采集血清并评估葡萄糖水平。ApoE^{-/-} 和 ApoE^{-/-}KLRK1^{-/-} 小鼠的葡萄糖水平是每组六只小鼠的平均值。两组的差异有统计学显著性 ($p < 0.05$)。

[0054] 图 13 显示在 2 型糖尿病动物模型肥沙鼠 (*Psammomys obesus*) (也称为沙鼠 (*sand rats*)) 中, 抗-NKG2D 抗体对糖尿病发生的影响。雄性和雌性肥沙鼠 (*P. obesus*, 以色列耶路撒冷的哈伦公司 (Harlan, Jerusalem, Israel)) 饲喂低能量 (2.4kcal/g) 饮食直到 9 周龄后, 将它们转移到随意高能量 (3.1kcal/g) 饮食条件下, 期间跟踪检测至多 10 天 (诱导期) 的体重 (BW) 和清晨血糖 (mBG)。将 mBG 水平升高 (定义为连续两个 mBG 读数 $> 10\text{mmol/L}$) 的动物转移回低能量饮食, 并于 10 天后当其 mBG 水平恢复非糖尿病水平时将其用于实际研究 (预防模式)。将诱导期 mBG 没有增加的动物处死, 不继续使用。(数据未显示)。用载体 ($N = 19$) 或 NKG2D-PE 抗体 (克隆 CX5) ($N = 9$) 处理肥沙鼠, 每周一次腹膜内注射。该项研究进行六周, 期间有规律地跟踪监测 mBG 和 BW。载体组的所有动物都患上严重的糖尿病, 平均 mBG 为 $14.5 \pm 2.6\text{mM}$ (平均值 \pm 标准误), 而用 NKG2D 抗体处理的动物仍然保持正

常血糖水平 (mBG < 8mM) 并且具有显著较低的 mBG ($8.0 \pm 1.9\text{mM}$, $p < 0.0001$ (平均值 \pm 标准误))。在肥沙鼠中 NKG2D 抗体处理完全抑制了 2 型糖尿病的发生, 在研究过程中由于出现严重的糖尿病酮酸中毒而不得不处死载体组的五只动物。两个治疗组的 BW 增加没有差异。

[0055] 图 14 显示 NKG2D 抗体结合肥沙鼠 (沙鼠, 2 型糖尿病动物模型) 的血细胞的流式细胞术分析。观察到抗 - 小鼠 NKG2D-PE 抗体 (克隆 CX5) 与沙鼠血液中的 NK 细胞发生剂量依赖性结合。这种结合有特异性, 因为同种型对照抗体 (大鼠 IgG1-PE 同种型对照 (R3-34) 和小鼠 IgG1-PE 同种型对照 (MOPC-21)) 或抗 - 人 NKG2D 抗体 (克隆 1D11 和克隆 ON72) 没有结合。

[0056] 定义

[0057] 除非另外定义, 本文中使用的所有技术术语具有本发明所属领域普通技术人员通常所理解的同样含义。

[0058] 本文所用的“蛋白质”和“多肽”是同义词, 指不考虑长度或翻译后修饰如糖基化或磷酸化时的任何肽连接的氨基酸链。

[0059] 本文所用术语“MICA/B 蛋白”或“MICA/B 多肽”指 I 类 MHC 链相关的 A 或 B 基因的表达产物, 如天然人 MICA 蛋白 (登录号 L14848), 或与上述蛋白质具有至少 65% (优选 75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%) 氨基酸序列相同性且显示天然 MICA 蛋白的功能活性的蛋白质, 或天然人 MICB 蛋白 (登录号 NM_005931), 或与上述蛋白质具有至少 65% (优选 75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%) 氨基酸序列相同性且显示天然 MICB 蛋白的功能活性的蛋白质。蛋白质的“功能活性”是与蛋白质的生理功能有关的任何活性。例如, 天然 MICA/B 蛋白的功能活性可包括结合 NKG2D 和诱导免疫激活, 例如分泌细胞因子。

[0060] 本文所用术语“NKG2D 蛋白”或“NKG2D 多肽”指 KLRK1 基因的表达产物, 如天然人 NKG2D 蛋白 (登录号 574240) 或与上述蛋白质具有至少 65% (优选 75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%) 氨基酸序列相同性且显示天然 NKG2D 蛋白的功能活性的蛋白质。例如, 天然 NKG2D 蛋白的功能活性可包括结合其配体和将信号转导到免疫细胞内以调节其基因表达和激活。

[0061] 本文所用术语“基因”指编码特定蛋白质, 或者在某些情况下编码功能或结构 RNA 分子的核酸分子。

[0062] 本文所用术语“MICA/B 基因”、“MICA 基因”、“MICB 基因”、“MICA/B 多核苷酸”、“MICA 多核苷酸”、“MICB 多核苷酸”、“MICA/B 核酸”、“MICA 核酸”、或“MICB 核酸”指天然人 MICA 或 MICB 编码核酸序列, 如天然人 MICA 基因 (登录号 L14848); 如天然人 MICB 基因 (登录号 NM_005931), 具有可转录成 MICA 或 MICB cDNA 的序列的核酸; 和 / 或上述物质的等位基因变体和同源物。该术语包括双链 DNA、单链 DNA 和 RNA。

[0063] 本文所用术语“KLRK1”、“Klrk1”、“KLRK1 基因”、“Klrk1 基因”、“NKG2D 基因”、“NKG2D 多核苷酸”或“NKG2D 核酸”指天然的人 NKG2D 编码核酸序列, 如天然人 KLRK1 基因 (登录号 574240); 具有可转录成 KLRK1cDNA 的序列的核酸; 和 / 或上述物质的等位基因变体和同源物。该术语包括双链 DNA、单链 DNA 和 RNA。

[0064] 本文所用术语“核酸”或“核酸分子”指两种或多种核苷酸链, 如 RNA (核糖核酸) 和 DNA (脱氧核糖核酸)。本文所述的核酸分子可以是 RNA 形式或 DNA 形式 (如 cDNA、基因

组 DNA 和合成 DNA)。DNA 可以是双链或单链,如果是单链,可以是编码(有义)链或非编码(反义)链。

[0065] 本文所用术语“患者”、“对象”和“个体”在本文中可互换使用,指治疗和/或从中获得生物样品的哺乳动物(如人)对象。

[0066] 本文所用术语“结合”、“结合于”或“相互作用”指一种分子识别和粘附于样品或生物体中特定的第二种分子,但不显著识别或粘附于样品中的其他结构不相关的分子。

[0067] 涉及探针或抗体时,本文所用术语“标记”旨在包括通过将可检测物质偶联(即物理连接)于该探针或抗体,对探针或抗体进行直接标记。

[0068] 涉及核酸分子或多肽时,本文所用术语“天然”指天然产生的(如 WT)核酸或多肽。

[0069] 本文所用术语“诊断的”、“诊断”、“诊断为”指鉴定病理学状况的存在或特性。

[0070] 本文所用术语“样品”在本文中以最广义使用。包含多核苷酸、肽、抗体等的样品可包括体液、细胞制品的可溶性组分或培养细胞的培养基、基因组 DNA、RNA 或 cDNA、细胞、组织、皮肤、毛发等。样品的例子包括唾液、血清、活检样品、血液、尿液和血浆。

[0071] 本文所用术语“序列相同性”指比对两条序列以最大程度提高亚基匹配,即考虑缺口和插入时,两条序列中相应位置上相同亚基的百分数。两条序列中的亚基位置被同一核苷酸或氨基酸占据时存在序列相同性,例如,若两个 DNA 分子的某个给定位置都被腺嘌呤占据,则这两个分子在该位置上相同。例如,若在长度为 10 个氨基酸的序列中有 7 个位置与长度为 10 个氨基酸的第二序列的相应位置相同,则这两个序列具有 70% 序列相同性。通常采用序列分析软件(例如,位于威斯康星州麦迪逊 53705 大学大道 1710 号的威斯康星大学生物技术中心的遗传计算机组 (Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705) 的序列分析软件包),测定序列相同性。

[0072] 涉及核酸分子中的突变时,“沉默”改变是取代该核苷酸序列中的一个或多个碱基对,但不改变该序列编码多肽的氨基酸序列。“保守性”改变是核酸的蛋白质编码区中的至少一个密码子发生改变,使得该核酸序列编码多肽的至少一个氨基酸被具有相似特性的另一氨基酸取代。

[0073] 本文所用术语“寡核苷酸”、“siRNA”、“siRNA 寡核苷酸”和“siRNA”在本说明书中可互换使用,包括天然和/或修饰单体或连接的线型或环状寡聚体,包括脱氧核糖核苷、核糖核苷、其取代和 α -异头形式、肽核酸(PNA)、锁定核酸(LNA)、硫代磷酸酯、甲基磷酸酯等。寡核苷酸能够通过单体-单体相互作用的规律模式,如沃森克里克型碱基配对、哈斯汀(Hoögsteen)或反向哈斯汀型碱基配对等特异性结合靶多核苷酸。

[0074] 本文所用术语“抗体”以最广义使用,具体包括全长单克隆抗体、多克隆抗体,和(除非另有说明或与上下文抵触)其抗原结合片段、抗体变体和多特异性分子,只要它们具有所需的生物学活性。通常,全长抗体是含有二硫键交联的至少两条重链(H)和两条轻链(L)的糖蛋白。每一重链由重链可变区(本文简写为 V_H)和重链恒定区组成。重链恒定区由三种结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 组成。每一轻链由轻链可变区(本文简写为 V_L)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 构成。 V_H 和 V_L 区域还可进一步细分为超变区,称为互补决定区(CDR),其间间插更保守的构架区(FR)。每一 V_H 和 V_L 由三个 CDR 和四个 FR 组

成,从氨基端到羧基端按照以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体分子结构和与产生抗体有关的各种技术的基本原理可参见,例如,Harlow 和 Lane, ANTIBODIES :A LABORATORY MANUAL (抗体:实验室手册),纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.) (1988)。例如,本文所述的抗-NKG2D 抗体能够结合干扰 NKG2D 激活和 / 或信号转导的 NKG2D 部分。本文所述抗-NKG2D 抗体还能够结合干扰 NKG2D 配体结合相互作用的 NKG2D 部分。

[0075] 本文所用术语抗体的“抗原结合片段”是包含能够可检测地结合抗原的部分全长抗体的分子,通常至少包含 V_H 区域的一个或多个部分。抗原结合片段包括含有一个、两个、三个或更多抗体的抗原结合部分的多价分子,和所述 V_L 和 V_H 区域或其所选部分通过合成接头或重组方法连接形成功能性抗原结合分子的单链构建物。虽然抗体的一些抗原结合片段可通过对较大抗体分子进行实际片段化(如酶切)获得,但通常大部分通过重组技术产生。

[0076] 本文所用术语“人抗体”旨在包括具有构架区和 CDR 区均衍生自(即相同或基本相同)人种系免疫球蛋白序列的可变区的抗体。而且,如果抗体含有恒定区,则该恒定区也“衍生自”人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可包含并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,随机或定点体外诱变引入的突变或体内体细胞突变)。然而,本文所用术语“人抗体”不应包括衍生自另一哺乳动物如小鼠种系的 CDR 序列被嫁接到人框架序列上的抗体。

[0077] 本文所用术语“人源化”抗体是含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列的人 / 非人嵌合抗体。多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(接受抗体),其中接受者的高变区的残基被非人物种,如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区(供体抗体)的残基取代,具有所需特异性、亲和力和性能。在一些情况下,人免疫球蛋白的 FR 残基被相应的非人残基所替换。而且,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。通常,人源化抗体将基本上包含至少一个、通常两个可变区的全部,其中全部或基本上全部的高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,全部或基本上全部的 FR 残基是人免疫球蛋白序列的 FR 残基。人源化抗体也可任选包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),一般是人免疫球蛋白的 Fc。更多详情可参见例如, Jones 等, Nature 321 : 522-525 (1986); Riechmann 等, Nature 332 : 323-329 (1988); 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2 : 593-596 (1992), WO 92/02190, 美国专利申请 20060073137 和美国专利 6750325、6632927、6639055、6548640、6407213、6180370、6054297、5929212、5895205、5886152、5877293、5869619、5821337、5821123、5770196、5777085、5766886、5714350、5693762、5693761、5530101、5585089 和 5225539。

[0078] 本文所用术语“构架区”或“FR”残基是除本文定义的 CDR 以外的 V_H 或 V_L 残基。

[0079] 本文所用术语“表位”或“结合位点”是抗原结合肽(如抗体)特异性结合的抗原的某个区或区域。蛋白质表位可包含直接参与结合的氨基酸残基(也称为该表位的免疫显性组件)和不直接参与结合的其他氨基酸残基,如被特异性抗原结合肽有效阻断的氨基酸残基(换言之,该氨基酸残基位于特异性抗原结合肽的“溶剂排除表面”和 / 或“足迹”之

内)。本文所用术语表位包括特异性结合抗-hNKG2D 抗体或本发明另一 hNKG2D 特异性物质的 hNKG2D 的任何特定区域内两种类型的氨基酸结合位点,除非另有说明(例如,在某些地方,本发明涉及直接结合特定氨基酸残基的抗体)。NKG2D 可包含多个不同表位,它们可包括但不限于,(1) 线性肽抗原决定簇,(2) 由成熟 NKG2D 构象中位置相邻的一个或多个非毗连氨基酸构成的构象抗原决定簇;和(3) 翻译后抗原决定簇,其完全或部分由共价连接于 NKG2D 的分子结构如糖基团构成。除非上下文另有说明或发生矛盾,构象抗原决定簇包括与抗原结合肽的原子的距离在约 4Å 内的 NKG2D 氨基酸残基。

[0080] 本文所用术语与感兴趣抗体(如 MS 或 21F2)“结合基本相同的表位或决定簇”指抗体与感兴趣抗体“竞争”感兴趣抗体特异性结合的 NKG2D 分子。

[0081] 如本文所述,抗-hNKG2D 抗体“阻断”NKG2D 分子与天然 NKG2D-配体(如 MICA)结合的能力指在利用可溶性或细胞表面相关 NKG2D 和配体分子进行的试验中,抗体可检测地以剂量依赖方式降低 NKG2D 分子与配体的结合,其中在该抗体缺失时,NKG2D 分子可检测地结合该配体。

[0082] 本文所用术语“NKG2D 配体结合相互作用”指 NKG2D 与其配体(如 MICA/B、ULBP/RAET1、Mult1、Rae-1 δ 、Rae-1 ϵ 和 H60b)之间的特异性识别和结合相互作用。可调节 NKG2D 配体结合相互作用的物质示例包括可溶性 NKG2D、特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段、NKG2D 配体和 NKG2D 配体活性或表达的抑制剂。

[0083] 胆固醇和甘油三酯水平高被认为是增加心血管病和 2 型糖尿病风险的脂质代谢失调。

[0084] 本文所用术语“糖尿病”指胰腺激素胰岛素相对或绝对缺陷引起的血糖水平升高导致的代谢疾病。糖尿病有两种形式:1 型糖尿病和 2 型糖尿病。1 型糖尿病的特征是靶向 β 细胞的破坏性自身免疫过程和这些细胞的再生能力之间失衡所致的胰腺 β 细胞进行性损失。这种失衡最终导致完全丧失 β 细胞和内源性胰岛素分泌。2 型糖尿病的特征是胰岛素抗性和 β 细胞功能受损,包括第一期胰岛素释放受损、 β 细胞脉冲质量降低和胰岛素缺陷。在优选实施方式中,本发明涉及 2 型糖尿病的治疗。

[0085] 本文所用术语“2 型糖尿病”指机体抵抗胰岛素作用或不产生足量胰岛素来维持正常葡萄糖水平的慢性病症。此外,它也指处于疾病早期的人群中出现的代谢功能障碍,如血脂异常。

[0086] 本文所用术语“心血管病”指影响心脏和血管相关功能的异常病症。

[0087] 本文所用术语“安全和有效量”指足以产生所需的治疗反应而不产生过度的不良副作用(如毒性、刺激或变态反应)某组分的用量,如本文所述使用时该用量应与合理的益处/风险比相称。

[0088] 本文所用术语“治疗有效量”指能有效产生所需治疗反应的本文所述组合物的用量,例如,有效延迟动脉粥样硬化斑块出现的用量或在糖尿病患者中有效降低血糖水平和促进体重降低的用量。

[0089] 具体的安全和有效量或治疗有效量取决于多种因素,例如所治疗的具体病症、患者身体状况、治疗的哺乳动物或动物类型、治疗持续时间、同时进行治疗(如果有)的性质和采用的具体制剂和化合物或其衍生物的结构。

[0090] 本文所用术语“治疗”定义为将治疗剂施加或给予患者,或将治疗剂施加或给予由

患者分离的组织或细胞系,该患者患有疾病、具有疾病症状或疾病倾向,其目的是治疗、治愈、减轻、缓解、改变、补救、改善、提高或影响该疾病、疾病症状或疾病倾向。例如,尚未鉴定到疾病或失调的症状或临床相关表现的患者的“治疗”是预防性或防止性治疗,而鉴定到疾病或失调的症状或临床相关表现的患者的临床、治愈性或缓解性“治疗”通常不构成预防性或防止性治疗。例如,在对象中治疗 2 型糖尿病包括降低血糖水平和降低对象的体重。抑制 2 型糖尿病疾病进展包括防止或抑制脂质代谢病症、降低胰岛素抗性、防止或抑制脂质代谢失调、提高葡萄糖耐受等。治疗 2 型糖尿病和抑制 2 型糖尿病疾病进展可包括缓解或防止糖尿病相关的症状、失调或疾病,如代谢综合征、糖尿病性视网膜病、肾衰竭、血液循环不畅和与其相关的肢体疾病。各治疗形式可被认为是本发明的不同方面。

[0091] 本文描述了包括常规分子生物学技术的方法。这些技术通常是本领域已知的,详见方法学著作,如 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (《分子克隆:实验室手册》),第 3 版,第 1-3 卷, Sambrook 等编,纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), 2001; 和 *Current Protocols in Molecular Biology* (《新编分子生物学实验指南》), Ausubel 等编,格林出版和韦利科学公司 (Greene Publishing and Wiley-Interscience), 纽约, 1992 (定期更新)。也可调整基因转移和基因治疗的常规方法,以便用于本发明。参见例如, *Gene Therapy: Principles and Applications* (《基因治疗:原理和应用》), T. Blackenstein 编,施普林格公司 (Springer Verlag), 1999; *Gene Therapy Protocols* (《基因治疗方案》) (刊于 *Methods in Molecular Medicine* (分子医学方法)), P. D. Robbins 编,休曼出版社 (Humana Press), 1997; 和 *Retro-vectors for Human Gene Therapy* (《人基因治疗的逆转录载体》), C. P. Hodgson 编,施普林格公司, 1996。免疫学技术通常是本领域已知的,详见方法学著作,如 *Advances in Immunology* (《免疫学进展》), 第 93 卷, Frederick W. Alt 编,马萨诸塞州伯灵顿的学术出版社 (Academic Press, Burlington, MA), 2007; *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook* (《制备和使用抗体:实践手册》), Gary C. Howard 和 Matthew R. Kaser 编,佛罗里达州伯克莱屯的 CRC 出版社 (CRC Press, Boca Raton, FL), 2006; *Medical Immunology* (《医学免疫学》), 第 6 版, Gabriel Virella 编,英国伦敦的 IHP 出版社 (Informa Healthcare Press, London, England), 2007; 以及 Harlow 和 Lane, *ANTIBODIES: A Laboratory Manual* (《抗体:实验室手册》), 纽约州冷泉港的冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), 1988。

[0092] 虽然在本发明的实施或测试中可以采用类似于或等同于本文所述的那些方法、组合物和药盒/试剂盒,但是下面描述了合适的方法、组合物和药盒/试剂盒。

[0093] 本文引用的所有出版物、专利申请和专利均通过引用全文纳入本文。在抵触的情况下,以本说明书(包括定义在内)为准。下文讨论的具体实施方式仅为说明性,不构成限制。

[0094] 发明详述

[0095] 本发明基于以下发现:某免疫刺激分子家族在糖尿病或脂质代谢功能障碍的患者和动物中上调,该家族对于心血管病的发生至关重要。本文所述的数据提供第一手证据表明 MICA/B 蛋白在 2 型糖尿病人类患者的血清中升高,并且将抗-NKG2D 抗体注射到糖尿病小鼠中阻断 NKG2D 配体相互作用并显著抑制动脉粥样硬化斑块形成。本文所述数据还显示

NKG2D/配体介导的免疫激活参与了2型糖尿病的疾病进展。将抗-NKG2D抗体注射到2型糖尿病动物模型中能够治疗糖尿病并显著降低血糖水平。阻断NKG2D/配体相互作用也能减轻异常的代谢病症,包括降低胆固醇和甘油三酯水平。

[0096] 因此,MICA/B和其他NKG2D配体是预测糖尿病患者发生2型糖尿病以及心血管病的新分子标记物,它们和NKG2D/配体相互作用是预防或治疗2型糖尿病以及其他异常代谢病症或疾病(如血脂异常、糖尿病性视网膜病、血液循环不畅、肢体失调)和心血管病(如动脉粥样硬化)的新靶点。

[0097] 因此,本发明提供检测和治疗2型糖尿病和其他异常代谢病症如心血管疾病或失调的新的方法、组合物和药盒/试剂盒。

[0098] NKG2D是多种免疫细胞如NK、NKT、ab T和gd T细胞表达的免疫刺激分子。通过关联配体刺激NKG2D引起表达NKG2D的免疫细胞的激活。存在多种分子可用作NKG2D配体,它们包括小鼠中的Rae-1、H60和Mult1的成员,以及人体中的MICA/B和ULBP/RAET1蛋白质家族。大多数NKG2D配体在正常细胞中不表达或低水平表达,但在各种疾病状况下上调,进而激活表达NKG2D的免疫细胞。虽然这种免疫激活在宿主防御如微生物免疫和肿瘤监控中起到重要作用,但它也可能产生免疫介导的疾病。

[0099] 在一个实施方式中,本发明提供检测来自对象的生物样品中的MICA/B蛋白,以检测该对象的2型糖尿病、心血管病、炎性疾病或代谢功能障碍相关疾病的存在或预测发病的方法和药盒/试剂盒。代谢功能障碍相关疾病包括高血糖、糖尿病性视网膜病、血液循环不畅、肢体失调和血脂异常(如高胆固醇和高甘油三酯)。

[0100] 本文实施例1中所示的数据表明,NKG2D配体在2型糖尿病患者中上调,其促进器官炎症和相关并发症。本文所述数据说明,在2型糖尿病人类患者的血清和动脉粥样硬化斑块中检测到MICA/B蛋白水平升高。还发现在糖尿病或非糖尿病ApoE^{-/-}小鼠(脂质代谢功能障碍和动脉粥样硬化的动物模型)的血管(特别是动脉粥样硬化病变区域)和肝脏中H60和Rae-1(视黄酸早期诱导基因-1)蛋白上调,以及在这些动物的血清中Mult1上调(参见实施例2)。因此,可利用NKG2D配体(如MICA/B蛋白或ULBP/RAET1蛋白)上调检测2型糖尿病、心血管病、炎性疾病或代谢功能障碍相关疾病的存在或预测发病。

[0101] 检测2型糖尿病、心血管病、炎性疾病或代谢功能障碍相关疾病发生倾向或者2型糖尿病、心血管病、炎性疾病或代谢功能障碍相关疾病的存在的典型方法包括从对象获得生物样品;使该生物样品与检测NKG2D配体表达(如MICA/B表达)的至少一种试剂相接触;测定该生物样品中NKG2D配体的表达水平;和将NKG2D配体过度表达与该对象的2型糖尿病、心血管病、炎性疾病或代谢功能障碍相关疾病发病倾向相关联。如实施例1所述数据所示,测定可溶性MICA/B的表达。然而,在一些实施方式中,可检测MICA/B表达的膜形式。代替MICA/B或除MICA/B外,可分析任何NKG2D配体的表达。例如,ULBP/RAET1蛋白质家族是NKG2D配体并发现其流入和存在于血清中,正如MICA/B那样,因此使得这些蛋白质成为本文所述方法、组合物和药盒/试剂盒的合适标记物。NKG2D配体描述于例如,Waldhauer, I. 和 A. Steinle, *Oncogene*, 27:5932-5943(2008)。

[0102] 在一些实施方式中,检测NKG2D配体表达(如MICA/B表达)的试剂可包括任何合适试剂,如MICA/B抗体和可溶性NKG2D。

[0103] 生物样品通常是血清。然而,可使用任何合适的生物样品。其他生物样品的例子

包括生物活检样品、血浆、尿、皮肤、血液和唾液。

[0104] 可采用任何合适的方法或试验来检测对象生物样品中 NKG2D 配体（如 MICA/B）的表达水平。许多基于抗体的检测形式是本领域众所周知的，包括 ELISA（酶联免疫吸附实验）、放射性免疫实验、免疫印迹、蛋白质印迹、流式细胞术、免疫荧光实验、免疫沉淀、蛋白 A 实验、免疫电泳实验和其他相关技术。在一些实施方式中，通过检测第一抗体上的标记测得抗体的结合。在另一实施方式中，通过检测第二抗体或试剂与第一抗体的结合测得第一抗体。在另一实施方式中，所述第二抗体带有标记。本领域已知并在本发明的组合物、药盒 / 试剂盒和方法范围内有多种方法用于在免疫试验中检测结合。可以在包括至少一种这些方法来检测 NKG2D 配体（如 MICA/B）表达的试剂盒中提供 MICA/B 或其他 NKG2D 配体的特异性抗体。该试剂盒可包含其他组件，包装、说明书或辅助进行蛋白质检测和试剂盒使用的其他材料。

[0105] 在对象中检测 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病或代谢功能障碍相关疾病的发病倾向或 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病或代谢功能障碍相关疾病的存在的方法包括将 MICA/B 或其他 NKG2D 配体的过度表达与该对象 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病或代谢功能障碍相关疾病发生倾向或患有 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病或代谢功能障碍相关疾病相关联。可通过将生物样品中 NKG2D 配体（如 MICA/B）的表达水平与 NKG2D 配体（如 MICA/B）表达的基线水平（也称为对照水平）作比较，确定该生物样品中是否过度表达一种或多种 NKG2D 配体（如 MICA/B）。“基线水平”是对照水平，在一些实施方式中，是正常水平或在患有 2 型糖尿病、炎性疾病或其他代谢功能障碍相关疾病和具有心血管病倾向的对象中未观察到的水平。因此，可根据 NKG2D 配体（如 MICA/B）表达的对照或基线水平确定待分析 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病或代谢功能障碍相关疾病发生情况的样品中 NKG2D 配体表达与基线水平相比是可检测地提高（即过度表达、上调）、降低或是基本不变。在某些实施方式中，可由测试对象的早先样品建立基线水平，以便随时间监控该对象的疾病状态和 / 或随时间评估给定治疗方案的功效。

[0106] 在检测对象中 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病或代谢功能障碍相关疾病发病倾向或者 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病或代谢功能障碍相关炎性疾病的存在的方法的一些实施方式中，还分析除 NKG2D 配体（如 MICA/B）外的一种或多种标记物的表达。所述一种或多种标记物也可以是 NKG2D 配体；可分析任何 NKG2D 配体的表达。可检测的其他标记物的例子包括 C 反应性蛋白、IL-6、TNF- α 、sICAM-1、sCD40、ULBP/RAET1 蛋白质家族（如 ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、RAET1G、RAET1L）等等。在分析除 NKG2D 配体（如 MICA/B）外的一种或多种标记物表达的实施方式中，NKG2D 配体（如 MICA/B）和其他生物标记物的组合可用于更可靠地预测血管疾病和 / 或代谢功能障碍相关疾病的发生。在这类实施方式中，将生物样品分别与检测 NKG2D 配体表达的至少一种试剂和检测除 NKG2D 配体（如 MICA/B）外的一种或多种标记物表达的两种或多种试剂相接触。测定 NKG2D 配体（如 MICA/B）和所述两种或多种其他标记物在生物样品中的表达水平；并将 NKG2D 配体（如 MICA/B）的过度表达与所述对象的 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和 / 或代谢功能障碍相关疾病（如血脂异常、糖尿病性视网膜病、血液循环不畅、肢体失调等）发生倾向相关联。根据特定的两种或多种其他标记物，可将它们的表达不足或过度表达与所述对象的 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和 / 或代谢功能障碍相关疾病发生倾向相关联。

[0107] 在另一实施方式中,本发明提供调节 NKG2D 配体(如 MICA/B 或 ULBP/RAET1 蛋白)表达(如抑制 MICA/B 或 ULBP/RAET1 表达)和活性(如与 NKG2D 结合),以治疗患有 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病或代谢功能障碍相关疾病的对象的组合物或方法。本文所述组合物也可用于治疗倾向于发生和/或已发生心血管病(如动脉粥样硬化)和/或患有代谢功能障碍相关疾病如高胆固醇或高甘油三酯、糖尿病、血脂障碍、糖尿病性视网膜病、血液循环不畅、肢体失调等的对象。这类组合物通常包含治疗有效量的调节一种或多种 NKG2D 配体(如 MICA/B 或 ULBP/RAET1)表达或活性/信号转导的药剂和药学上可接受的运载体。NKG2D 配体(如 MICA/B 或 ULBP/RAET1)的抑制剂有效降低细胞中 NKG2D 配体水平和/或降低细胞中 NKG2D 配体活性。有效降低细胞中 NKG2D 配体水平的 NKG2D 配体(如 MICA/B 或 ULBP/RAET1)抑制剂可以是 NKG2D 配体编码基因的转录或翻译抑制剂。此外,有效降低细胞中 NKG2D 配体水平的 NKG2D 配体抑制剂可刺激 NKG2D 配体和/或 NKG2D 配体编码 RNA 的降解。转录和/或翻译抑制剂可以是基于核酸的抑制剂,如与靶 NKG2D 配体 mRNA 互补的反义寡核苷酸,以及具有切割靶 mRNA 的催化活性的核酶和 DNA 酶。

[0108] 在一些实施方式中,本文所述组合物包含 NKG2D 配体编码基因的特异性 siRNA。序列特异性 siRNA 结合靶核酸分子,抑制其表达。提供了递送 siRNA 的组合物和治疗方法。构建和使用核酶、siRNA 和反义分子的方法是本领域众所周知的(例如,Isaka Y., *Curr Opin Mol Ther*,9:132-136(2007); Sioud M. 和 Iversen P.O., *Curr Drug Targets*,6:647-653(2005); Mouldy Sioud 的 *Ribozymes and siRNA Protocols*(核酶和 siRNA 方法)(*Methods in Molecular Biology*(分子生物学方法)),第 2 版,2004,纽约州纽约市的休曼出版社)。“反义”核酸可包含与编码蛋白质的“有义”核酸互补的核苷酸序列,例如,与双链 eDNA 分子的编码链互补或与 mRNA 序列互补。反义核酸可以与整个 MICA/B 编码链互补,或者仅与其一部分互补。在另一实施方式中,反义核酸分子与编码 NKG2D 配体的核苷酸序列编码链的“非编码区”(如 5' 和 3' 非翻译区)反义。反义物质可包括例如,约 8-80 个核碱基(即约 8-80 个核苷酸),例如,约 8-50 个核碱基,或约 12-30 个核碱基。反义化合物包括核酶、外部导向序列(EGS)寡核苷酸(寡酶(oligozymes))和与靶核酸杂交并调节其表达的其他短催化 RNA 或催化寡核苷酸。反义化合物可包括与靶基因序列互补的至少 8 个连续核碱基的臂。寡核苷酸不需要与其特异性杂交的靶核酸序列 100% 互补。在需要特异性结合的条件下,即,在体内测定或治疗性处理情况下处于生理条件,或者体外测定情况下处于进行该测定的条件,当寡核苷酸与靶点结合干扰该靶分子的正常功能导致可用性丧失,和有足够的互补程度以避免寡核苷酸与非靶序列的非特异性结合时,该寡核苷酸为可特异性杂交。

[0109] 在一些实施方式中,调节 NKG2D 配体表达(如抑制 MICA/B 或 ULBP/RAET1 表达)和活性(如与 NKG2D 结合)以治疗患有代谢功能障碍相关性炎性疾病如 2 型糖尿病,倾向于发生和/或已发生心血管病(如动脉粥样硬化)和/或患有异常代谢病症如高胆固醇或甘油三酯水平、血脂异常、糖尿病性视网膜病等的对象的组合物包含治疗有效量的阻断 NKG2D 与其一种或多种配体相互作用(如 NKG2D/MICA/B 相互作用)的药剂、药学上可接受的运载体和治疗 NKG2D/配体相互作用途径以外途径引起的心血管病、高血压或代谢失调的已知药物。治疗心血管病的已知药物的例子是 3-羟基-3-甲基戊二酰基辅酶 A 还原酶抑制剂(他汀类)中任何一种。他汀类的例子包括西立伐他汀、氟伐他汀、阿托伐他汀、斯伐他汀、

普伐他汀或洛伐他汀,或其药学上可接受的盐。包括他汀类的组合物和方法是本领域众所周知的(参见例如,美国专利号 6,465,454)。

[0110] 在另一实施方式中,本发明提供一种治疗 2 型糖尿病、心血管病、炎症疾病和 / 或异常代谢病症(如高胆固醇水平、高甘油三酯水平、血脂异常、血液循环不畅、肢体失调、糖尿病性视网膜病等)的组合物,其包含阻断 NKG2D 与其一种或多种配体相互作用(如 NKG2D/MICA/B 相互作用)的药剂和药学上可接受的运载体。在另一实施方式中,所述组合物包含抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂和药学上可接受的运载体。

[0111] 本文实施例 3 所示数据表明,用抗 -NKG2D 抗体阻断 NKG2D 配体结合相互作用能够抑制糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠的斑块形成,而不改变 NKG2D 表达细胞的数量。

[0112] 可采用任何适合阻断 NKG2D 与其一种或多种配体相互作用(如 NKG2D/MICA/B 相互作用)或者抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂。例如,所述药剂可选自下组:可溶性 NKG2D、特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段、NKG2D 配体和 NKG2D 配体活性或表达的抑制剂。

[0113] 抑制 NKG2D 激活或信号转导或者阻断 NKG2D 与其一种或多种配体相互作用的典型药剂是特异性结合 NKG2D 的抗体。在一些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段结合人 NKG2D(hNKG2D)。

[0114] 可采用任何合适的特异性结合 NKG2D 的抗体。本文所述的抗 -NKG2D 抗体包括多克隆和单克隆人抗体,或具有免疫球蛋白可变区的至少一个抗原结合区的抗原结合片段部分,所述抗体特异性结合 NKG2D。如果用该多肽的表位产生抗体且至少与天然或重组蛋白的一部分结合,则该抗体对 NKG2D 有特异性。抑制 NKG2D 激活或信号转导的另一药剂例子是特异性结合 NKG2D 配体(如 MICA/B、ULBP)的抗体。可采用任何合适的特异性结合 NKG2D 配体的抗体。

[0115] 通过竞争性抑制确定单克隆抗体特异性和亲和力的方法可参见 Harlow 等, *Antibodies: A Laboratory Manual* (《抗体:实验室手册》),纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.), 1988, Colligan 等编, *Current Protocols in Immunology* (《新编免疫学实验指南》),纽约的格林出版联合公司和韦利科学公司(Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N. Y.), (1992, 1993) 和 Muller, *Meth. Enzymol.* 92 :589-601 (1983), 所述参考文献通过引用全文纳入本文。

[0116] 在一些实施方式中,特异性结合 NKG2D 的抗体是具有下述序列的人单克隆抗体 16F16、16F31、MS 和 21F2。在一些实施方式中,所述抗体是人单克隆抗体 MS。这些抗体的全长、可变和 CDR 序列见表 1。

[0117] 表 1. 16F16、16F31、MS 和 21F2 的全长、可变和 CDR 氨基酸序列

[0118]

抗体部分	SEQ ID NO :	抗体部分	SEQ ID NO :
16F16 IgG4 H 链	1	MS IgG4 H 链	21
16F16 L 链	2	MS L 链	22
16F3 IgG4 H 链	3	21F2 IgG4H 链	23
16F16 L 链	4	21F2 L 链	24
16F16 VH 区	5	MS VH 区	25
16F16 VL 区	6	MS VL 区	26

16F31 VH 区	7	21F2 VH 区	27
16F31 VL 区	8	21F2 VL 区	28
16F16 VH CDR1	9	MS VH CDR1	29
16F16 VH CDR2	10	MS VH CDR2	30
16F16 VH CDR3	11	MS VH CDR3	31
16F16 VL CDR1	12	MS VL CDR1	32
16F16 VL CDR2	13	MS VL CDR2	33
16F16 VL CDR3	14	MS VL CDR3	34
16F31 VH CDR1	15	21F2 VH CDR1	35
16F31 VH CDR2	16	21F2 VH CDR2	36
16F31 VH CDR3	17	21F2 VH CDR3	37
16F31 VL CDR1	18	21F2 VL CDR1	38
16F31 VL CDR2	19	21F2 VL CDR2	39
16F31 VL CDR3	20	21F2 VL CDR3	40

[0119] 可按照下述方法,常规地制备本文所述的抗-NKG2D和抗-NKG2D配体抗体,例如但不限于,用多肽或抗原性片段接种合适动物、体外刺激淋巴细胞群、合成方法、杂交瘤和/或表达编码这类抗-NKG2D抗体的核酸的重组细胞。用纯化的重组NKG2D或其肽片段免疫动物是制备抗-NKG2D抗体的方法的一个例子。相似地,用纯化的重组NKG2D配体(例如ULBP/RAET1蛋白、MICA/B、Mu1t1等中的一种)或其肽片段免疫动物是制备抗-NKG2D配体抗体的方法的一个例子。

[0120] 可通过本领域技术人员已知方法获得特异性结合NKG2D或NKG2D配体的单克隆抗体。参见例如Kohler和Milstein, *Nature* 256:495-497, 1975; 美国专利号4,376,110; Ausubel等编, *Current Protocols in Molecular Biology* (《新编分子生物学实验指南》), 纽约的格林出版联合公司和韦利科学公司, (1987, 1992); Harlow和Lane *ANTIBODIES: A Laboratory Manual* (《抗体:实验室手册》), 纽约州冷泉港的冷泉港实验室出版社, 1988; Colligan等编, *Current Protocols in Immunology* (《新编免疫学实验指南》), 纽约的格林出版联合公司和韦利科学公司, (1992, 1993), 将其内容通过引用全文纳入本文。这类抗体可属于任何免疫球蛋白类, 包括IgG、IgM、IgE、IgA和其任何亚类。产生本发明单克隆抗体的杂交瘤可以在体外、原位或体内培养。

[0121] 在另一实施方式中,抑制NKG2D激活或信号转导的药剂是可溶性NKG2D。可溶性NKG2D可通过本领域已知的任何合适方法制备(参见例如,Diefenbach等, *Nat Immunol.* 第1卷(2):119-26, 2000)。在一个实施方式中,通过任何合适的递送途径和方式给予可溶性NKG2D。在另一实施方式中,可将编码可溶性NKG2D的核酸给予对象以治疗2型糖尿病、心血管病、炎性疾病和/或代谢功能障碍相关疾病(如高胆固醇水平、高甘油三酯水平、血脂异常、血液循环不畅、肢体失调、糖尿病性视网膜病等)。编码可溶性NKG2D蛋白的编码序列可与登录号574240的核苷酸序列相同,或者也可能是与登录号574240的多核苷酸编码相同多肽的,因遗传密码的冗余性和简并性而不同的编码序列。本文所述的其他核酸分子包括天然NKG2D基因的变体,例如编码天然NKG2D蛋白的片段、类似物和衍生物的那些变体。例如,这类变体可以是天然产生的天然NKG2D基因的等位基因变体,天然NKG2D基因的同源物,或者非天然产生的天然NKG2D基因的变体。这些变体的核苷酸序列与天然NKG2D基因有一个或多个碱基的差异。例如,这类变体的核苷酸序列可包含天然NKG2D基因的一个或多个核苷酸的缺失、添加或取代。

[0122] 在另一实施方式中,抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂可以是可溶性 NKG2D 配体。已证明, MICA/B 的流出(可溶)形式能抑制整个机体的 NKG2D 功能。在这类实施方式中,可将可溶性 NKG2D 配体或编码可溶性 NKG2D 配体的核酸给予对象,以治疗 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和 / 或代谢功能障碍相关疾病(如高胆固醇水平、高甘油三酯水平、血脂异常、血液循环不畅、肢体失调、糖尿病性视网膜病等)。

[0123] 在其它实施方式中,结构中出现显著改变的变体 NKG2D 蛋白或 NKG2D 配体(如 MICA/B、ULBP/RAET1 蛋白等)可通过在编码多肽中引起低于保守性改变的核苷酸取代制得。这类核苷酸取代的例子是造成(a)多肽主链结构;(b)多肽电荷或疏水性;或(c)氨基酸侧链容量改变的取代。通常预计,对蛋白质性质产生最大改变的核苷酸取代是导致密码子中发生非保守性改变的取代。可能引起蛋白质结构发生较大变化的密码子改变的例子是引起下述取代的改变:(a)亲水性残基,如丝氨酸或苏氨酸取代(或被其取代)疏水性残基,如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸;(b)半胱氨酸或脯氨酸取代(或被其取代)任何其他残基;(c)具有带正电侧链的残基如赖氨酸、精氨酸或组氨酸取代(或被其取代)带负电残基,如谷氨酰胺或天冬酰胺;或(d)具有较大侧链的残基,如苯丙氨酸取代(或被其取代)无侧链的残基,如甘氨酸。

[0124] 如本文所述的天然产生的天然 Klrk1 基因或天然 Klrk1 mRNA 的等位基因变体是与天然 Klrk1 基因或天然 Klrk1 mRNA 有至少 75% (如 76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 和 99%) 序列相同性、且编码与天然 Klrk1 蛋白结构相似多肽的分离自人组织的核酸。本文所述的天然 Klrk1 基因或天然 Klrk1 mRNA 的同源物是与天然人 Klrk1 基因或天然人 Klrk1 mRNA 有至少 75% (如 76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 和 99%) 序列相同性,且编码与天然人 NKG2D 蛋白结构相似多肽的分离自其他物种的核酸。可检索公共和 / 或专有的核酸数据库,以鉴定与天然 Klrk1 基因或天然 Klrk1 mRNA 具有高序列相同性百分数(如 70、80、90% 或更高)的其他核酸分子。

[0125] 非天然产生的 Klrk1 基因或 mRNA 变体是非天然产生的(例如人造的)、与天然人 Klrk1 基因或天然人 Klrk1 mRNA 具有至少 75% (如 76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 和 99%) 序列相同性,并编码与天然人 NKG2D 蛋白结构相似的多肽的核酸。非天然产生的 Klrk1 基因变体的例子是编码 NKG2D 蛋白片段的变体、在严格条件下与天然 Klrk1 基因或天然 Klrk1 基因的互补物杂交的变体、与天然 Klrk1 基因或其互补物有至少 65% 序列相同性的变体、和编码 NKG2D 融合蛋白的变体。

[0126] 编码本文所述天然 NKG2D 蛋白片段的核酸是编码,例如天然 NKG2D 蛋白的 2、5、10、25、50、100、150、200 或更多个氨基酸残基的核酸。编码天然 NKG2D 蛋白片段的编码核酸或与其杂交的较短的寡核苷酸(如长度是 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、50 个碱基对)可用作探针、引物或反义分子。编码天然 NKG2D 蛋白片段的核酸可通过酶切(例如,使用限制性酶)或化学降解全长天然 Klrk1 基因、Klrk1 mRNA 或 cDNA 或其变体来制备。利用以前报道的天然人 Klrk1 基因的核苷酸序列和天然 NKG2D 蛋白的氨基酸序列,本领域技术人员可通过例如标准核酸诱变技术或化学合成产生核苷酸序列中变化很小

的核酸分子。可表达变体 K1rk1 核酸分子以产生变体 NKG2D 蛋白。

[0127] 在一些实施方式中,抑制 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和 / 或治疗异常代谢病症 (如高胆固醇水平、高甘油三酯水平、血脂异常、糖尿病性视网膜病、肢体失调、血液循环不畅等) 的组合物包含阻断 NKG2D 与其一种或多种配体相互作用 (如 NKG2D/MICA/B 相互作用) 的药剂 (如抗 -NKG2D 抗体或抗 -NKG2D 配体抗体)、药学上可接受的运载体和治疗心血管病的已知药物。治疗心血管病的已知药物的例子是 3- 羟基 -3- 甲基戊二酰基辅酶 A 还原酶抑制剂 (他汀类) 中的任何一种。他汀类的例子包括西立伐他汀、氟伐他汀、阿托伐他汀、斯伐他汀、普伐他汀或洛伐他汀,或其药学上可接受的盐。包括他汀类的组合物和方法是本领域众所周知的 (参见例如,美国专利号 6, 465, 454)。

[0128] 本文实施例 3 所示数据表明,用抗 -NKG2D 抗体阻断 NKG2D 配体结合相互作用能在糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠中显著抑制动脉粥样硬化斑块形成,提示 NKG2D/ 配体相互作用是促进心血管病发生的关键途径,并可用作预防或治疗心血管病的药物靶点。本文实施例 3 和 4 所示数据还表明利用 NKG2D 敲除小鼠和抗 -NKG2D 抗体进行研究时,NKG2D/ 配体相互作用在动脉粥样硬化和炎症中的关键作用。阻断 NKG2D/ 配体相互作用也能减轻异常的代谢病症,包括降低胆固醇和甘油三酯水平,如实施例 5 所示。进一步比较抗 -NKG2D 抗体治疗组和对照组的细胞因子表达概况表明,抗 -NKG2D 抗体治疗显著抑制多种促炎细胞因子的产生,提示它通过防止血管炎症起作用 (参见实施例 4)。本文所述数据还显示 NKG2D/ 配体介导的免疫激活参与了 2 型糖尿病的疾病进展。在本文实施例 7 所述实验中,与饲喂西方饮食的 ApoE^{-/-} 小鼠相比,饲喂相同饮食的 NKG2D 缺陷型 ApoE^{-/-}-K1rk1^{-/-} 小鼠的血糖水平明显较低,说明靶向 NKG2D 或其配体治疗 2 型糖尿病的有效性。而且,在 2 型糖尿病的啮齿动物模型中,抗 -NKG2D 抗体治疗能够防止高血糖和糖尿病的发生和进展,如实施例 8 所述。

[0129] 在另一实施方式中,本发明提供在对象中治疗 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和 / 或异常代谢病症 (如高胆固醇水平、高甘油三酯水平、血脂异常、糖尿病性视网膜病、肢体失调、血液循环不畅等) 的方法。在某些实施方式中,本发明用于治疗 2 型糖尿病。在另一实施方式中,本发明提供在对象中治疗可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症的方法。这类病症包括,例如,2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和 / 或异常代谢病症 (如高胆固醇水平、高甘油三酯水平、血脂异常、糖尿病性视网膜病、肢体失调、血液循环不畅等)。在某些实施方式中,所述病症是 2 型糖尿病。在某些其它实施方式中,所述病症是心血管病。

[0130] 典型方法包括将治疗有效量的抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂和药学上可接受的运载体给予对象,以抑制 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和 / 或异常代谢病症。在某些实施方式中,所述方法包括给予治疗有效量的阻断 NKG2D 配体结合相互作用的药剂。该药剂可以是任何上述物质,例如,可溶性 NKG2D、特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段、可溶性 NKG2D 配体、NKG2D 配体的特异性抗体、NKG2D 配体 (如 MICA/B) 活性或表达的抑制剂。在某些实施方式中,所述药剂是特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段是人或人源化的。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段结合人 NKG2D (hNKG2D)。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段降低 NKG2D 介导的 NKG2D 表达细胞的激活或信号转导。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段与至少一种 NKG2D 配体竞争结合 NKG2D。在某些实施方式中,所述 NKG2D 配体是 MICA/B。

[0131] 在某些实施方式中,给予所述药剂导致对象出现下述反应中至少一种:血糖水平降低、葡萄糖耐受提高、胰岛素抗性降低、体重降低、血压降低、炎症减轻或代谢功能障碍减轻。

[0132] 本文所述的治疗方法(包括预防性治疗)通常包括将治疗有效量的本文所述组合物给予需要的对象(如动物、人),包括哺乳动物,特别是人。这类治疗适合给予患有、具有、倾向于发生、有风险发生疾病、失调或其症状的对象,特别是人。可通过任何客观或主观判断由诊断测试或者对象或健康护理提供者的意见(如遗传测试、酶或蛋白质标记物、标记物(如本文所述)、家族史等),确定有“风险”的对象。本文所述组合物也可用于治疗可能牵涉 NKG2D 信号转导、表达或活性过高的任何其他失调。

[0133] 在一个实施方式中,在对象中治疗 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和 / 或异常代谢病症(如高胆固醇水平、高甘油三酯水平、血脂异常、糖尿病性视网膜病、肢体失调、血液循环不畅等)的方法包括监测治疗进程。可以通过在患有或易患与 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和 / 或异常代谢病症(如高胆固醇水平、高甘油三酯水平、血脂障碍、糖尿病性视网膜病、肢体失调、血液循环不畅等)相关的失调或其症状的对象中测定诊断标记物(例如,本文所述的组合物或药剂等调节的本文所述任何靶点、蛋白质或其指示物等)水平或诊断测试(如筛选、试验)来监测治疗进程,其中所述对象已经给予足以治疗疾病或其症状的治疗量的本文所述组合物。可将所述方法测定的标记物水平与健康正常对照或其他患病患者中已知的标记物水平作比较,以确立该对象的疾病状态。通常,在测定第一水平后的时间点测定对象的第二标记物水平,比较这两个水平以监测病程或疗效。在某些实施方式中,在开始本文所述的治疗之前测定对象的治疗前标记物水平;然后,可将这种治疗前标记物水平与治疗开始后该对象的标记物水平作比较,以确定疗效。

[0134] 给予包含 NKG2D 配体活性或表达的抑制剂(如 MICA/B 抑制剂)、可溶性 NKG2D、可溶性 NKG2D 配体、抗 -NKG2D 抗体、抗 -NKG2D 配体抗体等的组合物以治疗糖尿病、心血管病(如动脉粥样硬化)和 / 或异常代谢病症(如高胆固醇水平、高甘油三酯水平、血脂异常、糖尿病性视网膜病、肢体失调、血液循环不畅等)可通过任何合适方式进行,其在治疗浓度下与其他组分联用能有效改善、减轻或消除 2 型糖尿病、心血管病(如抑制动脉粥样硬化斑块形成)、炎性疾病和 / 或异常代谢病症(如高胆固醇水平、高甘油三酯水平、血脂异常、糖尿病性视网膜病、肢体失调、血液循环不畅等)。NKG2D 配体活性或表达的抑制剂(如 MICA/B 抑制剂)、可溶性 NKG2D、可溶性 NKG2D 配体、抗 -NKG2D 抗体、抗 -NKG2D 配体抗体等可以任何合适量包含在任何合适载体物质中,通常其存在量为组合物总重量的 1-95 重量%。该组合物可以适合局部或全身给药(如胃肠外、皮下、静脉内、肌肉内或腹膜内)的剂型提供。在某些实施方式中,通过静脉内、腹膜内或皮下途径给予所述组合物。药物组合物可按照常规药学实践配制(参见例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy(《雷明顿: 药剂学科学和实践》)(第 20 版),A. R. Gennaro, Lippincott Williams 和 Wilkins 编,2000 和 Encyclopedia of Pharmaceutical Technology(《药学技术百科全书》),J. Swarbrick 和 J. C. Boylan 编,1988-1999,纽约的 MD 出版社(Marcel Dekker))。

[0135] 本文所述的组合物可通过注射、输注或植入(皮下、静脉内、肌肉内、腹膜内等)胃肠外给予,采用含有常规、无毒的药学上可接受载体和佐剂的剂型、制剂或经合适递送装置或植入体。这类组合物的配制和制备是药物配制领域技术人员众所周知的。配制可参见

Remington: The Science and Practice of Pharmacy (《雷明顿: 药剂学科学和实践》), 同上。

[0136] 胃肠外使用的组合物可以单位剂型提供(如装在单剂量安瓿中), 或以含有若干剂量的小瓶提供, 其中可加入合适的防腐剂(见下)。该组合物可以是溶液剂、混悬剂、乳液剂、输注装置或植入递送装置等形式, 或者可以制成干粉, 临用前用水或另一合适载体重建。除活性药剂外, 该组合物可包含合适的胃肠外可接受的运载体和/或赋形剂。可将活性治疗剂掺入微球、微胶囊、纳米颗粒、脂质体等进行控释。而且, 该组合物可包含混悬剂、增溶剂、稳定剂、pH 调节剂、张力调节剂和/或分散剂。

[0137] 如上所述, 本发明药物组合物可以是适合无菌注射的形式。为了制备这种组合物, 将合适的活性治疗剂溶解或悬浮于胃肠外可接受的液体载体中。可以使用的可接受载体和溶剂是水, 通过加入适量的盐酸、氢氧化钠或适当缓冲液 1,3-丁二醇、林格溶液以及等张氯化钠溶液和右旋糖溶液将水调节到适当的 pH。水性制剂也可包含一种或多种防腐剂(如对羟基苯甲酸甲酯、乙酯或正丙酯)。在一种化合物只是难溶或微溶于水的情况下, 可加入溶解增强剂或增溶剂, 或者溶剂可包含 10-60% w/w 丙二醇等。

[0138] 用于制备微球和/或微胶囊的材料是, 例如, 可生物降解/可生物侵蚀的聚合物, 如远志皂甙 (polygalactin)、聚(氰基丙烯酸异丁酯)、聚(2-羟乙基-L-谷氨酸)和聚(乳酸)。配制控释胃肠外制剂时可采用的生物相容性运载体是糖(如右旋糖苷)、蛋白质(如白蛋白)、脂蛋白或抗体。植入体所用的材料可以是不可生物降解的(如聚二甲基硅氧烷)或可生物降解的(如聚(己内酯), 聚(乳酸), 聚(乙醇酸)或聚(原酸酯)或其组合)。

[0139] 一种制剂中可混合至少两种抗心血管病治疗剂(如 NKG2D 或 MICA/B 抑制剂和他汀)。

[0140] 本文所述的组合物还可以与第二种或更多种药理活性剂联用, 例如, 这些药理活性剂选自下组: 抗糖尿病药、抗肥胖药、食欲调节药、抗高血压药、治疗和/或预防糖尿病导致或与糖尿病相关的并发症的药剂、和治疗和/或预防肥胖导致或与肥胖相关的并发症和失调的药剂。药理活性物质的例子是: GLP-1 和 GLP-1 衍生物和类似物、GLP-2 和 GLP-2 衍生物和类似物、重组促胰岛素分泌肽-4 和重组促胰岛素分泌肽-4 衍生物和类似物、糊精和糊精衍生物和类似物、磺脲、双胍、氯茴苯酸、葡糖苷酶抑制剂、胰高血糖素拮抗剂、DPP-IV(二肽基肽酶-IV)抑制剂、SGLT2 抑制剂、SGLT1 抑制剂、参与刺激糖异生和/或糖原分解的肝脏酶的抑制剂、葡萄糖摄取调节剂, 调节脂质代谢的化合物, 例如, 抗高血脂药如 HMG CoA 抑制剂(他汀类), 降低食物摄入的化合物、RXR 激动剂和作用于 β 细胞的 ATP 依赖性钾通道的药剂; 考来烯胺、考来替泊、氯贝丁酯、吉非贝齐、洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、普罗布考、右旋甲状腺素、那格列奈、瑞格列奈; β -阻断剂如阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔和美托洛尔, ACE(血管紧张素转化酶)抑制剂如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、阿拉普利(alatriopril)、喹那普利和雷米普利, 钙通道阻断剂如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔硫卓和维拉帕米, 和 α -阻断剂如多沙唑嗪、乌拉地尔、哌唑嗪和特拉唑嗪; CART(可卡因安非他明调节的转录物)激动剂、NPY(神经肽 Y)拮抗剂、PYY(多肽 YY)激动剂、PP(胰腺多肽)激动剂、Y2 受体激动剂、Y4 受体激动剂、混合的 Y2/Y4 受体激动剂、脂联素激动剂、PPAR 激动剂、MC4(黑

皮质素 4) 激动剂、阿立新拮抗剂、TNF(肿瘤坏死因子) 激动剂、CRF(促肾上腺皮质激素释放因子) 激动剂、CRF BP(促肾上腺皮质激素释放因子结合蛋白) 拮抗剂、尿皮质素激动剂、 β 3 激动剂、MSH(促黑色素细胞激素) 激动剂、MCH(黑色素细胞聚集激素) 拮抗剂、CCK(胆囊收缩素) 激动剂、血清素再摄取抑制剂、血清素和去甲肾上腺素再摄取抑制剂、混合的血清素和去甲肾上腺素能化合物、5HT(血清素) 激动剂、铃蟾肽激动剂、甘丙肽拮抗剂、生长激素、生长激素释放化合物、TRH(促甲状腺激素释放激素) 激动剂、UCP 2 或 3(非偶联的蛋白质 2 或 3) 调节剂、瘦激素激动剂、DA 激动剂(溴隐亭、多普辛)、脂肪酶/淀粉酶抑制剂、RXR(类视黄醇 X 受体) 调节剂、TR β 激动剂;组胺 H3 拮抗剂、胃泌素和胃泌素类似物和衍生物、胰高血糖素和胰高血糖素衍生物和类似物、FGF-21(成纤维细胞生长因子 21) 和 FGF-21 衍生物和类似物、质子泵抑制剂如兰索拉唑、奥美拉唑、右旋兰索拉唑、艾美拉唑、泮托拉唑和雷贝拉唑,以及葡糖激酶活化剂。

[0141] 应理解,本发明组合物与一种或多种上述化合物,以及任选的一种或多种其他药理活性物质的任何合适组合也考虑落入本发明范围。

[0142] 虽然许多上述组合物、方法和试剂盒/药盒均涉及治疗 2 型糖尿病和心血管病,但本文所述的组合物和方法也可用于在对象中预防任何代谢功能障碍相关疾病,包括 2 型糖尿病和心血管病。在某些实施方式中,本发明组合物和方法可防止或消除疾病症状、延迟疾病症状的发生或减轻疾病的严重程度。

[0143] 在其它实施方式中,本文所述的组合物和方法可用于在对象中检测、预防和/或治疗代谢功能障碍相关疾病,无论该对象是否患有 2 型糖尿病。例如,本文描述了在对象中检测胆固醇和甘油三酯水平升高的方法,包括由所述对象获得生物样品,使所述生物样品与检测 NKG2D 配体表达(如 MICA/B 表达)的至少一种试剂相接触;测定 NKG2D 配体在该生物样品中的表达水平;并将 NKG2D 配体(如 MICA/B)的过度表达与对象具有胆固醇和甘油三酯水平升高的倾向或者存在胆固醇和甘油三酯水平升高相关联。治疗胆固醇和甘油三酯水平升高的对象(可能患有或未患 2 型糖尿病)的方法包括将治疗有效量的抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂和药学上可接受的运载体给予该对象,以降低胆固醇和甘油三酯水平。本文所述另一个例子是治疗患有糖尿病性视网膜病的对象的方法。这种方法包括将治疗有效量的抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂和药学上可接受的运载体给予该对象,以抑制糖尿病性视网膜病。抑制 NKG2D 激活或信号转导以抑制糖尿病性视网膜病或降低胆固醇和甘油三酯水平的药剂可以是任何上述药剂,例如,可溶性 NKG2D、NKG2D 特异性抗体、可溶性 NKG2D 配体、NKG2D 配体特异性抗体、NKG2D 配体(如 MICA/B)活性或表达的抑制剂等。所述药剂和药学上可接受的运载体可包装到上述药盒/试剂盒中。

[0144] 在其他实施方式中,治疗 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和/或代谢功能障碍相关疾病(如高胆固醇水平、高甘油三酯水平、血脂异常、血液循环不畅、肢体失调、糖尿病性视网膜病等)的组合物和方法可包括促进 NKG2D 配体从细胞表面脱落的药剂。常常用蛋白酶将 NKG2D 配体从细胞表面切下(称作“脱落”),通常认为通过脱落配体与 NKG2D 结合并下调 NKG2D 活性(如信号转导),脱落能抑制 NKG2D 信号转导。任何促进或抑制脱落的药剂均可调节 NKG2D 信号转导和活性,并可用于这类实施方式。例如,可将参与脱落的蛋白质的抗体或抗原结合片段给予对象,给药量能有效促进至少一种 NKG2D 配体的脱落。

[0145] 此外,本文所述的组合物、药盒/试剂盒和方法可用于在对象中预防代谢功能障

碍相关疾病。例如,医生可将本文所述的组合物和方法给予因家族原因(遗传学)或环境因素(如饮食、缺乏锻炼等)具有心血管病和/或代谢功能障碍相关疾病倾向的对象。

[0146] 优选将有效量的上述组合物给予对象(如人),所述有效量能够在治疗对象中产生所需结果(如抑制或预防2型糖尿病、心血管病如动脉粥样硬化,在2型糖尿病患者中降低血糖水平和促使体重降低,降低对象的胆固醇或甘油三酯水平,降低对象的胰岛素抗性,预防或缓解对象的血脂异常、糖尿病性视网膜病、肢体失调、血液循环不畅等)的用量。本文所述组合物的毒性和疗效可通过标准药理学方法测定。如医学和兽医学领域所熟知,用于任何一种动物的剂量取决于多种因素,包括对象的大小、体表面积、年龄、给予的特定组合物、给药时间和给药途径、总体健康状况和同时给予的其他药物。

[0147] 治疗剂的给予量根据给药方式、患者年龄和体重以及癌症的临床症状而定。通过鉴定动脉粥样硬化斑块形成、血糖水平、体重、胆固醇水平、甘油三酯水平、胰岛素抗性等的降低,或利用测定 NKG2D 配体(如 MICA/B 或 ULBP/RAET1)的表达或生物学活性或者 NKG2D 活性或信号转导的试验所测定,本文所述组合物的给予剂量通常能抑制 NKG2D 活性和/或信号转导。

[0148] 本文所述检测来自对象(如人)的生物样品中 NKG2D 配体(如 MICA/B 或 ULBP/RAET1 蛋白)的试剂盒/药盒可用于检测对象中2型糖尿病、心血管病、炎性疾病和/或异常代谢病症(如高胆固醇水平、高甘油三酯水平、血脂异常、糖尿病性视网膜病、肢体失调、血液循环不畅等)的存在或预测发病。典型的药盒/试剂盒包括检测来自对象的生物样品中 NKG2D 配体(如 MICA/B 或 ULBP/RAET1)表达的至少一种试剂和使用说明书。在一个实施方式中,药盒/试剂盒包括 ULBP/RAET1 蛋白或 MICA/B 的单克隆或多克隆抗体,可检测标记和使用说明书。生物样品通常是血清。然而,可使用任何合适的生物样品。其他生物样品的例子包括血液、血浆、尿液、唾液、皮肤和生物活检样品。

[0149] 本文还公开了将治疗给予患有糖尿病或可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的任何病症,如2型糖尿病、心血管病、炎性疾病和/或异常代谢病症(如高胆固醇水平、高甘油三酯水平、血脂异常、糖尿病性视网膜病、肢体失调、血液循环不畅等)的对象(如人)的药盒。在一个实施方式中,所述药盒包括治疗或预防性组合物,其在单位剂型中含有治疗有效量的阻断 NKG2D 和其一种或多种配体相互作用(如 NKG2D/MICA/B 相互作用、NKG2D 和 ULBP/RAET1 蛋白之一相互作用等)或抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂和药学上可接受的运载体。所述药剂可以是可溶性 NKG2D、特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段、NKG2D 配体和 NKG2D 配体活性或表达的抑制剂。在某些实施方式中,所述药剂是特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段是人或人源化的。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段结合人 NKG2D(hNKG2D)。

[0150] 如果需要,所述药盒还包含有效量的治疗心血管病的已知药物(如他汀)和/或治疗异常代谢病症(如高胆固醇水平、高甘油三酯水平、血脂异常、糖尿病性视网膜病、肢体失调、血液循环不畅等)的药物。

[0151] 在某些实施方式中,所述药盒还包括至少一种选自下组的额外药剂:抗糖尿病药、抗肥胖药、食欲调节药、抗高血压药、治疗和/或预防糖尿病导致或与糖尿病相关的并发症的药剂、和治疗和/或预防肥胖导致或与肥胖相关的并发症和失调的药剂。

[0152] 通常,本文所述药盒/试剂盒包括包装和使用说明书。在一些实施方式中,所述药

盒/试剂盒包括无菌容器,其中含有治疗或预防性组合物;这类容器可以是盒、安瓿、瓶、小瓶、管、袋、囊、起泡包装或本领域已知的其他合适的容器形式。这种容器可由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或适合保持药物的其他材料制成。

[0153] 下面的具体实施例进一步说明了本发明。提供这些实施例仅用于说明目的,且不应以任何方式对本发明范围构成限制。

实施例

[0154] 实施例 1:检测 2 型糖尿病患者的血清和动脉粥样硬化斑块中的 NKG2D 配体 MICA、以及其与其他促炎细胞因子的表达的关联

[0155] 为了确定代谢功能障碍是否可能引起某些应激反应免疫刺激分子上调,在一组确认患有糖尿病的 2 型糖尿病患者(某些病例还出现血脂异常)中评价 MICA/B 表达。不包括 1 型糖尿病患者,因为他们主要是自身免疫病,可能出现不依赖代谢状况的 MICA 上调,如 1 型糖尿病 NOD 小鼠研究所示(Ogasawara 等, *Immunity*, 20 :757-767 (2004))。由于分析患者血管上的 MICA/B 表达不切实际,因而测定血液中可溶性 MICA (sMICA) 蛋白的水平。sMICA 是细胞表面上表达的膜 MICA (mMICA) 的酶促切割产物,已报道在各种癌症患者和免疫疾病患者的血液中检测到它,但在健康人群中检测不到。因此,检测糖尿病患者血液中的 sMICA 能说明血管或其他组织中 MICA 上调。

[0156] 检测了二十二位患者,在相当比例的患者中检测到 sMICA 水平升高(图 1A)。在这 22 位患者中,6 位(27%)的血清 MICA 水平高于 400pg/ml,最高达 12250pg/ml(图 1A,患者 #1-6)。此外,4 位患者(18%)具有可检测水平的血清 sMICA (50-350pg/ml)(图 1A,患者 #7-10)。为了确定糖尿病患者中 sMICA 水平是否与癌症患者相当,也检测了来自不同癌症患者的 50 个血清样品。2 型糖尿病患者的 sMICA 蛋白水平明显高于癌症患者,因为 50 位癌症患者的 sMICA 水平均低于 20pg/ml(图 1E)。虽然癌症患者的 sMICA 水平因癌症类型和阶段差异很大,但与文献报道的癌症患者的 sMICA 水平相比,2 型糖尿病患者的水平仍然处于高位(Salih 等, *J Immunol.*, 169 :4098-4102 (2002); Groh 等, *Nature*, 419 :734-738 (2002))。

[0157] 考虑到这些患者已被诊断为糖尿病 1 至 20 年且出现各种健康状况,但他们的 sMICA 水平不同并不出乎意料。尽管有所不同,但发现了与高血清 sMICA 水平相关的某些趋势,特别是将高 MICA 患者与 MICA 阴性对象作比较时。具体说,高 MICA 患者的平均血糖水平高于 MICA 阴性患者(190 ± 65 与 157 ± 47 ; $p = 0.1$)。血液中 sMICA 蛋白水平高表明某些细胞类型上表达膜 MICA,如果在动脉上,则可能通过与其在多种免疫细胞上表达的受体 NKG2D 相互作用影响血管炎症。应注意,虽然 MICA 蛋白的膜和可溶性形式均能结合 NKG2D,但他们对免疫激活具有不同影响。NKG2D/mMICA 结合激活免疫细胞,而 NKG2D/sMICA 相互作用则不激活。事实上, sMICA 可通过与 mMICA 竞争结合 NKG2D 来干扰 NKG2D/mMICA 相互作用介导的免疫激活。因此,分析糖尿病患者血清中若干炎症相关细胞因子和因子的表达,尝试将它们与可溶性 MICA 表达相关联。

[0158] 评价同一糖尿病患者的血清中细胞因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、干扰素- γ (IFN- γ) 和 C-反应性蛋白(CRP)的水平,以确定 sMICA 上调是否与任何这些参数相关(图 1B-D)。IL-1 β 和 IFN- γ 均低于这些试验的可检测范围。sMICA/B 和 TNF- α 或

CRP 水平之间没有相关性 (图 1A, C&D), 说明 MICA 表达的调节不同于 TNF- α 或 CRP (两种已有明确定义的炎症标记物)。有趣的是, 血清中的 sMICA/B 和 IL-6 表达之间存在逆相关 (图 1A 和 B)。MICA 阳性组 (患者 #1-10) 中 IL-6 的血清水平明显低于 MICA 阴性组 (患者 #11-22) ($1.21 \pm 0.51 \text{ ng/ml}$ 与 $1.85 \pm 1.13 \text{ ng/ml}$, $P = 0.05$), 提示这两个因子之间有相互依赖关系。

[0159] 总之, 这些数据证明, MICA/B 分子在 2 型糖尿病患者中上调, 该分子可能参与血管炎症和动脉粥样硬化。虽然高水平的 sMICA 明确表明在糖尿病患者中 MICA 上调, MICA 上调对炎症和动脉粥样硬化的净效应取决于可溶性和膜 MICA 蛋白的相对贡献。产生 sMICA 通常是 mMICA/NKG2D 相互作用的补偿机制, 用于调节免疫激活。因此, 利用小鼠模型直接评估动脉中的 NKG2D 配体上调和它在炎症和动脉粥样硬化中的重要性。

[0160] 为了进一步确定 NKG2D 配体表达的临床相关性, 对人患者的动脉粥样硬化主动脉切片进行免疫组化染色, 以确定 NKG2D 配体在该组织中是否上调。与无斑块主动脉 (图 2I) 不同, 动脉粥样硬化主动脉中的许多细胞呈现 MICA/B 抗体染色阳性 (图 2A、C、E 和 G)。相邻切片中 MICA/B 与 Mac-3 或 CD31 的重叠染色图表明, 动脉粥样硬化主动脉的巨噬细胞和内皮细胞表达 MICA/B (图 2B、D、F、H), 提示在人受影响组织中具有相似的 NKG2D 配体表达图。

[0161] 实施例 2: 在 ApoE^{-/-} 小鼠的动脉粥样硬化斑块和其他组织的细胞中 NKG2D 配体上调

[0162] 为了直接检测 NKG2D 配体在糖尿病和血脂异常小鼠的血管中是否上调, 测定 ApoE^{-/-} 小鼠中 NKG2D 配体的表达, ApoE^{-/-} 小鼠是血脂异常和动脉粥样硬化的动物模型。已确定, ApoE^{-/-} 小鼠中慢性功能障碍代谢导致出现动脉粥样硬化斑块, 其中免疫细胞占相当大部分。这些小鼠的脂质代谢受损, 并且随着年龄增加发生动脉粥样硬化。在出现动脉粥样硬化斑块的 ApoE 缺失小鼠的主动脉中分析 NKG2D 配体上调。

[0163] 首先, 在主动脉, 特别是主动脉弓区域出现动脉粥样硬化斑块的 8-10 月龄 ApoE^{-/-} 小鼠 (未诱导糖尿病) 的主动脉中检测 NKG2D 配体的 mRNA 表达。根据图 3A, 为了具体测定斑块病变是否具有不同的 NKG2D 配体表达水平, 从 8-10 月龄非糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠 (“动脉粥样硬化 ApoE^{-/-}”) 的动脉粥样硬化主动脉弓 (“有斑块”) 和没有明显斑块 (“无斑块”) 的主动脉胸段单独分离 RNA。2 月龄无斑块 ApoE^{-/-} 小鼠 (“无斑块 ApoE^{-/-}”) 的主动脉对应部分的 RNA 用作对照。为了更具体地测定不同单独 NKG2D 配体的上调, 使用 Rae-1 基因的不同同种型以及 H60 和 Mult-1 基因的同种型特异性引物。Rae-1、H60 和 MULT-1 都是属于不同家族的 NKG2D 配体 (Diefenbach 等, *Nature Immunology*, 1:119-126 (2000); Takada 等, *J Immunol.*, 180:1678-1685 (2008))。小鼠中鉴定到 5 种紧密关联的 Rae-1 基因 (> 98% 相同) 和三种不同的 H60 基因同种型 (H60a、b 和 c) (Diefenbach 等, *Nature Immunology*, 1:119-126 (2000); Takada 等, *J Immunol.*, 180:1678-1685 (2008))。通过半定量放射性 RT-PCR 分析 Rae-1 δ 、Rae-1 ϵ 和 H60 的转录物。简要说, 用超级转录物 (Superscript) II RNA 酶 -H 逆转录酶和寡聚 -dT 引物逆转录 RNA 样品。连续稀释 RT 产物 (各 5 倍), 并在 P³² dCTP 存在下用基因特异性引物进行 PCR。所用引物是基于报告基因序列 (Diefenbach 等, *Nature Immunology*, 1:119-126 (2000); Takada 等, *J Immunol.*, 180:1678-1685 (2008))。在聚丙烯酰胺凝胶上运行 PCR 产物, 然后将凝胶干燥, 并在磷成像屏

(Phospho-Image screen) 上曝光。 β -激动蛋白用作加样对照。

[0164] 与对照相比, Rae-1 δ 、Rae-1 ϵ 和 H60b 转录物在动脉粥样硬化 ApoE 缺失小鼠的斑块区显著上调 (图 3A)。与无动脉粥样硬化的幼年 ApoE 缺失对照相比, 在斑块区域中检测到 Rae-1 δ 、Rae-1 ϵ 和 H60b 转录物至多增加 100 倍 (图 3A)。即使与同一小鼠的主动脉的非斑块部分相比, 在斑块区域中检测到 Rae-1 δ 、Rae-1 ϵ 和 H60 β 基因增加 10-20 倍 (图 3A)。与无动脉粥样硬化的幼年 ApoE^{-/-} 小鼠的相应区域相比, 老年 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉的非斑块区的 Rae-1 δ & ϵ 适度上调。与年龄匹配的野生型 (WT) 对照相比, 检测到饲喂西方饮食 (WD) 的 ApoE^{-/-} 小鼠的主动脉弓中 NKG2D 配体 Rae-1 δ 、Rae-1 ϵ 和 H60b 转录物水平高得多 (增加 10-30 倍) (图 3B)。这些数据提示, 动脉粥样硬化斑块的某些细胞组件中 NKG2D 配体表达有非常显著的上调。

[0165] 为了进一步确认 NKG2D 配体在斑块中上调, 用多克隆抗-Rae-1 和 H60 抗体对 ApoE 缺失小鼠的动脉粥样硬化斑块的冰冻切片进行免疫组化染色。由于糖尿病和高脂肪西方饮食会加速斑块形成, 并且可能参与 NKG2D 配体的上调, 还检测通过注射链脲霉素 (STZ) 或饲喂西方饮食使其患上糖尿病的 ApoE 缺失小鼠的斑块。根据图 3C, 在 STZ 治疗中, 通过连续六天腹腔内注射链脲霉素 (STZ) (55mg/kg, 新鲜溶解于 pH 4.5 柠檬酸盐缓冲液) 诱导六周龄 ApoE 缺失小鼠 (缅因州巴港的杰克逊实验室公司 (Jackson Lab, Bar Harbor, Maine)) 发生糖尿病, 确认血糖浓度 (> 300mg/dL)。诱导糖尿病两个月后, 分离主动脉并进行冰冻切片。

[0166] 用多克隆山羊抗-Rae-1 或 H60 抗体 (R&D 系统公司和圣克鲁兹生物技术公司 (R&D Systems and Santa Cruz Biotechnology)) 对冰冻切片进行染色, 然后用辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的驴抗山羊 IgG 抗体和 ABC-HRP 染色系统染色, 观察阳性染色 (棕色) (圣克鲁兹生物技术公司)。

[0167] 还用单克隆大鼠抗小鼠 CD68 抗体 (Serotec) 进行切片染色, 接着用碱性磷酸酶 (AP) 偶联的驴抗大鼠抗体和 ABC-AP 染色试剂盒进行染色 (蓝色) (载体实验室公司 (Vector Laboratory))。在饲喂西方饮食的 ApoE^{-/-} 动脉粥样硬化模型中, 六周龄 ApoE 缺失小鼠从正常饮食转为西方饮食。饲喂西方饮食两个月后, 分离主动脉并进行冰冻切片, 用抗-Rae-1 和 H60 抗体染色进行分析 (图 3D)。

[0168] 在斑块区域的切片中 Rae-1 和 H60 阳性染色很明显, 但在糖尿病和非糖尿病 ApoE 缺失小鼠的动脉粥样硬化主动脉弓区域的中膜或外膜中这些染色则弱得多 (图 3C 和 3D)。作为对照, 在同一小鼠的无斑块主动脉区域中基本上检测不到 Rae-1 或 H60 染色 (图 3D, 下图)。CD68 (组织存留巨噬细胞的标记物) 染色与 RAE-1 和 H60 染色明显重叠, 表明浸润斑块的巨噬细胞是至少一个表达 NKG2D 配体的斑块的细胞群, 其通过流式细胞术分析直接分离自动脉粥样硬化主动脉的巨噬细胞上的 Rae-1 表达来进一步确认 (图 3E)。此外, 分离自动脉粥样硬化 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉的内皮细胞也具有较高的 Rae-1 表达 (图 3E)。

[0169] 鉴于其代谢缺陷, ApoE^{-/-} 小鼠的巨噬细胞很可能因血液和组织中异常代谢物增加而上调 NKG2D 配体表达。因此, 测定可否在体外培养物中通过氧化 LDL (oxLDL) 或晚期糖基化终产物 (AGE) (与血脂异常和糖尿病有关的两种异常代谢物) 诱导巨噬细胞。如图所示, 在 oxLDL 和 AGE 存在下培养时, 野生型小鼠的巨噬细胞在转录物和蛋白质水平显著上调多种 NKG2D 配体的表达 (图 3F-H)。根据图 3F, 培养 2 天后, 从不同处理的巨噬细胞中分离

mRNA, 逆转录产生 cDNA, 作五倍连续稀释, 并进行 PCR 以检测 NKG2D 配体 Rae-1 δ 、Rae-1 ϵ 和 H60b。根据图 3G, 对与图 3F 相同方式处理的巨噬细胞进行裂解, 在 PAGE 凝胶上分离, 并用与 Rae-1 分子所有同种型发生反应的抗 -Rae1 抗体进行蛋白质印迹分析。根据图 3H, 根据流式细胞术分析, 用 oxLDL 或 AGE 培养的野生型巨噬细胞的细胞表面 Rae-1 染色水平较高。Rae-1 染色可被无色“冷”抗 RAE-1 抗体竞争掉, 确认 NKG2D 配体的特异性上调 (图 3H)。

[0170] 总之, 这些实验证明有脂质和 / 或葡萄糖代谢疾病小鼠的动脉中多种 NKG2D 配体上调。斑块病变中 NKG2D 配体显著上调提示, NKG2D 配体在促进血管炎症和动脉粥样硬化中有直接作用。有趣的是, 只有在斑块中的细胞如巨噬细胞中, NKG2D 配体的转录物和蛋白质上调最显著。鉴于斑块中的许多细胞响应脂质组分而活化, 这些数据提示在不同类型的细胞中通过应激响应性和免疫激活途径可能诱导 NKG2D 配体上调。

[0171] 实施例 3: 通过阻断 NKG2D/ 配体与单克隆抗 -NKG2D 抗体的相互作用或敲除 NKG2D 抑制 ApoE 缺失小鼠的斑块形成

[0172] 在动脉中, 尤其是斑块上, NKG2D 配体上调可能激活表达 NKG2D 的免疫细胞, 从而促进血管炎症和动脉粥样硬化。为了检测这一论述, 将单克隆抗 -NKG2D 抗体 (克隆 MI-6) 注射到糖尿病 ApoE 缺失小鼠中阻断潜在的 NKG2D/ 配体相互作用, 并测定这种阻断可否抑制斑块形成。已证明, 注射抗 -NKG2D 抗体能在小鼠中阻断 NKG2D/ 配体相互作用, 而不损失表达 NKG2D 的免疫细胞 (Jamieson 和 Raulet, 未发表)。C57BL/6 背景的六周龄雄性纯合子 ApoE 缺失小鼠通过 STZ 注射诱导发生糖尿病, 以加速斑块形成。在给予 STZ 之前一周和三天, 通过腹膜内注射将 200 微克 / 注射的单克隆抗 -NKG2D 抗体 (克隆 MI-6, 大鼠 IgG2a) 给予 ApoE 缺失小鼠。在对照组中, 以相同方式处理小鼠, 不同之处在于给予同种型匹配的对照抗体, 而不是抗 -NKG2D 抗体。诱导糖尿病后, 小鼠保持正常饮食 8 周, 在这一期间的整个实验过程中将抗 -NKG2D 或对照抗体以每周一次给予小鼠。最后一次抗体注射后 1 周, 处死小鼠, 并分析主动脉的动脉粥样硬化病变。

[0173] 与注射同种型匹配对照抗体的小鼠相比, 注射抗 -NKG2D 抗体的糖尿病 ApoE 缺失小鼠的斑块形成明显减少 (图 4)。在用抗 -NKG2D 抗体处理的所有七只小鼠和用对照抗体处理的八只小鼠中 (在三次独立实验中), NKG2D- 抗体处理小鼠的斑块尺寸总是小于对照抗体处理小鼠 (图 4A)。为了进一步确定抑制斑块形成的程度, 对七只抗 -NKG2D 抗体处理小鼠中的五只和八只对照抗体处理小鼠中的六只 (两次单独实验), 用油红 O 染料对主动脉正面进行染色, 以观察沉积的脂质组分。在对照抗体处理小鼠的主动脉弓区域中存在大量油红 O 染色 (图 4B, 右侧三个)。相反, 抗 -NKG2D 抗体处理小鼠中染色强度低得多 (图 4B, 左侧两个), 这进一步说明抗 -NKG2D 抗体阻断能抑制脂质沉积和斑块形成。平均来看, 抗 -NKG2D 抗体处理小鼠的油红 O 染色阳性面积相较对照减少约 5 倍 (图 5A)。

[0174] 确认 NKG2D- 抗体治疗特异性阻断 NKG2D 而不诱导 NKG2D 表达细胞的损失后, 发现在抗 -NKG2D 和对照抗体处理小鼠中存在相同数量的 NK1. 1+NK 细胞和 NKT 细胞, 并且抗 -NKG2D 抗体处理小鼠的 NK 细胞正常表达 NKG2D。

[0175] 此外, 抗 -NKG2D 抗体治疗不导致表达 NKG2D 的免疫细胞全部变成无反应性。

[0176] 在体外试验中, 抗 -NKG2D 处理小鼠的 NK 细胞响应抗 -NK1. 1 抗体刺激表达干扰素 γ , 其效率与对照处理小鼠相同。总之, 这些实验证明, NKG2D/ 配体相互作用介导的免

疫激活在动脉粥样硬化中起到重要作用,阻断这类相互作用能抑制动脉粥样硬化。

[0177] 为了证明 NKG2D/ 配体相互作用在动脉粥样硬化中的关键作用,将 ApoE^{-/-} 小鼠与 NKG2D 敲除小鼠杂交,产生 ApoE/NKG2D 双敲除 (ApoE^{-/-}-KLRK1^{-/-}) 小鼠。用两种模型检测 ApoE/NKG2D 双敲除对动脉粥样硬化发生的影响。第一种模型是 STZ 诱导性糖尿病,如抗 -NKG2D 抗体阻断实验所用 (图 4)。第二种模型是西方饮食加速的动脉粥样硬化,其中小鼠从六周龄开始饲喂高脂肪饮食。糖尿病发病或西方饮食开始 8-10 周后,通过正面油红 O 染色分析 ApoE^{-/-}-KLRK1^{-/-} 小鼠的主动脉上的斑块形成。根据油红 O 染色阳性面积,患有糖尿病和饲喂西方饮食的 ApoE^{-/-}-KLRK1^{-/-} 小鼠的斑块比相同方式处理的 ApoE^{-/-}-KLRK1^{+/+} 小鼠显著缩小 (图 5B 和 C)。这些发现提供遗传证据说明 NKG2D/ 配体相互作用在动脉粥样硬化中的重要作用。此外,它们也提供证据说明此种相互作用广泛参与糖尿病和血脂异常相关动脉粥样硬化,提示可使用靶向该分子相互作用治疗和预防各种来源的动脉粥样硬化。

[0178] 实施例 4:在动脉粥样硬化 ApoE 缺失小鼠中阻断 NKG2D/ 配体相互作用降低促炎细胞因子表达

[0179] 由于在多种表达 NKG2D 的免疫细胞类型中 NKG2D/ 配体相互作用介导免疫激活,所以抗 -NKG2D 抗体阻断抑制动脉粥样硬化说明它通过抑制炎症发挥作用。为了检测这一论断,在斑块分析时收集抗 -NKG2D 和对照抗体处理的糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠的血清,采用小鼠促炎 7 重试剂盒 (美索发现公司 (Meso Scale Discovery)) 分析血清以及其它对照小鼠血清中多种促炎细胞因子的水平。与对照抗体处理的小鼠相比,抗 -NKG2D 抗体处理小鼠中所评价的 7 种细胞因子中有五种 (IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10 和 IL-12p70) 降低 (图 6)。最显著的是,IL-6 显著降低至年龄匹配的健康野生型 B6 小鼠或没有血脂异常或糖尿病的幼年 ApoE^{-/-} 小鼠的水平 (降低超过 10 倍, $p < 0.001$)。在抗 -NKG2D 处理的小鼠中,TNF- α 降低至不可检测的水平。这些数据表明,在糖尿病 ApoE^{-/-} 小鼠中 NKG2D/ 配体相互作用的抗体阻断能抑制炎症,从而预防动脉粥样硬化。

[0180] 抗 -NKG2D 抗体处理的小鼠中 IL-6 减少与糖尿病患者血清中的可溶性 MICA 和 IL-6 水平逆相关 (图 1)。鉴于抗 -NKG2D 抗体和 sMICA 通过干扰 NKG2D 介导的免疫活化发挥作用,人患者中高水平 sMICA 可能是天然产生的炎症抑制机制。

[0181] 还在 KLRK1^{-/-}-ApoE^{-/-} 小鼠中观察到促炎细胞因子产量降低。与糖尿病或饲喂西方饮食的 NKG2D 充足的 ApoE^{-/-} 小鼠相比,类似处理的 KLRK1^{-/-}-ApoE^{-/-} 小鼠的大部分促炎细胞因子的血清水平降低 (图 7)。在 NKG2D- 抗体处理的 KLRK1^{-/-}-ApoE^{-/-} 小鼠的血清中,多种炎症细胞因子 (IL-6、IFN- γ 、IL-12 和 TNF- α) 也降低。需要注意的是,所有模型中 IL-6 和 IFN- γ 显著降低。总之,这些结果说明,防止 NKG2D/ 配体相互作用能抑制炎症和减轻动脉粥样硬化。

[0182] 实施例 5:防止 NKG2D/ 配体相互作用能缓解 ApoE^{-/-} 小鼠的异常代谢病症

[0183] 除减轻动脉粥样硬化和炎症外,防止 NKG2D/ 配体相互作用也能显著缓解代谢疾病。与饲喂西方饮食的 ApoE^{-/-} 小鼠血清的混浊外观形成鲜明对比的是,以相似方式饲喂的 KLRK1^{-/-}-ApoE^{-/-} 小鼠血清澄清 (图 8A),这提示其血液中脂质组分的累积减少。确认后,KLRK1^{-/-}-ApoE^{-/-} 小鼠的胆固醇和甘油三酯的血清水平显著低于 ApoE^{-/-} 小鼠 (图 8B)。鉴于异常脂质代谢条件直接产生动脉粥样硬化并促进炎症,这些结果提示 NKG2D/ 配

体相互作用能促进炎症和代谢功能障碍的正反馈循环,从而维持动脉粥样硬化进展。

[0184] 总之,这些结果说明,异常代谢条件相关性 NKG2D 配体上调是动脉粥样硬化的重要因素,抑制 NKG2D/配体相互作用能通过减轻炎症和缓解异常代谢失调抑制疾病进展,这提示它是动脉粥样硬化治疗中有吸引力的治疗靶点。

[0185] 实施例 6:在 ApoE^{-/-}小鼠中防止 NKG2D/配体相互作用能抑制肝脏炎症

[0186] 饲喂西方饮食的 NKG2D⁻敲除 ApoE^{-/-}小鼠中胆固醇和甘油三酯的血清水平降低说明 NKG2D/配体介导的免疫激活会加重代谢功能障碍。由于肝脏是脂质代谢的主要器官,NKG2D/配体相互作用介导的炎症很可能通过损害其功能加重异常代谢病症。实际上,与 ApoE^{-/-}小鼠相比,NKG2D⁻敲除 ApoE^{-/-}小鼠的血清丙氨酸转氨酶 (ALT) 活性明显较低(图 9),说明肝脏功能障碍得到缓解。利用得克萨斯州奥斯汀的生物科学公司 (Bioo Scientific, Austin, TX) 的试剂盒,按照生产商说明书测定血清中的 ALT 活性。每组使用至少 5 只小鼠。**P < 0.01。

[0187] 检测防止 NKG2D/配体相互作用是否减少肝脏炎症的量。与 ApoE^{-/-}小鼠相比,离体培养的 NKG2D⁻敲除 ApoE^{-/-}小鼠的肝脏外植体产生的 IL-6 明显减少,说明炎症减轻(图 10A)。此外,与 ApoE^{-/-}小鼠相比,在 NKG2D⁻敲除 ApoE^{-/-}小鼠中包括巨噬细胞、NKT 和 NK 细胞在内的各种免疫细胞的数量均减少(图 10B),说明预防 NKG2D/配体相互作用确实减轻了肝脏炎症。

[0188] 研究了何种免疫细胞受 NKG2D/配体相互作用影响从而产生肝脏炎症。如动脉粥样硬化主动脉那样,ApoE^{-/-}小鼠肝脏的 NKG2D 配体高度上调(图 11A)。与野生型对照相比,ApoE^{-/-}小鼠肝脏的巨噬细胞和肝细胞的 Rae-1 表达水平都上调(图 11B-D)。对应于饲喂西方饮食的 ApoE^{-/-}小鼠肝脏中上调的配体,这些小鼠肝脏中表达 NKG2D 的免疫细胞,如 NK 细胞,特别是 NK T 细胞生成相当量的细胞因子,包括 IFN- γ 和 IL-4,而小鼠也缺少 NKG2D 时显著降低(图 11E 和 F)。相反,无论 ApoE^{-/-}小鼠是否表达 NKG2D,在所述小鼠中不表达 NKG2D 的肝脏巨噬细胞产生高水平 IL-6(图 11G)。然而,如上所述,Klrl1^{-/-}ApoE^{-/-}小鼠中巨噬细胞的数量显著减少,表明巨噬细胞受 NKG2D 介导炎症的间接影响。这些发现说明,异常代谢病症能诱导 NKG2D 配体上调,特别是在异常代谢物累积的组织如动脉粥样硬化斑块和肝脏中,因此 NKG2D/配体相互作用是针对动脉粥样硬化的有用的干扰靶点。

[0189] 实施例 7:防止 NKG2D/配体相互作用降低饲喂西方饮食的 ApoE^{-/-}小鼠的葡萄糖水平

[0190] 在一个实验中,向 8 周龄的 ApoE^{-/-}和 NKG2D 缺陷型 ApoE^{-/-}Klrl1^{-/-}小鼠饲喂西方饮食 3 个月。然后收集血清,并在饲喂方案结束时评估葡萄糖水平。饲喂西方饮食 3 个月后,平均来看,ApoE^{-/-}Klrl1^{-/-}小鼠的葡萄糖水平明显低于 ApoE^{-/-}小鼠(图 12),这说明防止 NKG2D/配体相互作用可抑制高血糖症的进展。

[0191] 实施例 8:在 2 型糖尿病啮齿动物模型中抗 -NKG2D 抗体防止高血糖和糖尿病的发生和进展

[0192] 为了进一步确定阻断 NKG2D 对 2 型糖尿病发生和进展的影响,将抗 -NKG2D 抗体给予肥沙鼠(也称为沙鼠),它是 2 型糖尿病的沙鼠动物模型。

[0193] 雄性和雌性肥沙鼠(以色列耶路撒冷的哈伦公司 (Harlan, Jerusalem, Israel)) 饲喂低能量 (2.4kcal/g) 饮食直到 9 周龄后,将它们转移到随意高能量 (3.1kcal/g) 饮食

条件下,期间跟踪检测至多 10 天(诱导期)的体重(BW)和清晨血糖(mBG)。将 mBG 水平升高(定义为连续两个 mBG 读数 > 10mmol/L)的动物转移回低能量饮食,并于 10 天后当其 mBG 水平恢复非糖尿病水平时将其用于实际研究(预防)。将诱导期 mBG 没有增加的动物处死,不继续使用。

[0194] 用载体(N = 19)或 NKG2D-PE 抗体(克隆 CX5)(N = 9)处理肥沙鼠,每周一次腹腔内注射。NKG2D 啮齿动物抗体试剂包含 CX5 OP001- 大约 10EU/ml 或 0.96mg/ml。将 45ml 的一个小瓶(溶解于 PBS 缓冲液)在 4°C 保温,所用的剂量体积是 0.52ml/kg 或 0.5mg/kg。

[0195] 该项研究进行六周,期间有规律地跟踪监测 mBG 和 BW。为了测定 mBG(mmol/L),从尾尖毛细血管采血样,装入 10 μ l 玻璃毛细管中,立即悬浮于 E P 管的缓冲液(500 μ l 百森(Biosen)分析缓冲液)中,在测试日分析葡萄糖。

[0196] 在研究期间,载体组的五只动物和 NKG2D 抗体组的一只动物由于 mBG 严重升高和酮酸中毒不得不处死。该研究得到丹麦司法部动物实验监察委员会(Animal Experiments Inspectorate, Ministry of Justice, Denmark)的批准。

[0197] 如图 13 所示,第一次给予载体或 NKG2D 抗体后 6 周,载体组的所有动物都患上严重的糖尿病,平均 mBG 为 14.5 ± 2.6 mM(平均值 \pm 标准误),而用 NKG2D 抗体处理的动物仍然保持正常血糖水平(mBG < 8mM)并且具有显著较低的 mBG(8.0 ± 1.9 mM, $p < 0.0001$ (平均值 \pm 标准误))。两个治疗组的 BW 增加没有差异。这些发现说明,在与 2 型糖尿病患者具有许多相同特征的啮齿动物模型中 NKG2D 在明显 2 型糖尿病的发病中起到非常重要的作用(可能通过减轻炎症、胰岛素抗性和 β 细胞失效)。通过用抗体阻断 NKG2D 的作用,在肥沙鼠中高能量饮食诱导的 2 型糖尿病发病被完全消除。

[0198] 为了确认抗-NKG2D 抗体的特异性,用流式细胞术分析肥沙鼠的血细胞的 NKG2D 抗体结合。

[0199] 简要说,在 100 μ l 等分样品中对 EDTA 稳定化的沙鼠血液染色,使用 NKG2D 抗体或同种型对照:抗-小鼠 NKG2D-PE(克隆 CX5)、大鼠 IgG1-PE 同种型对照、抗-人 NKG2D-PE(克隆 1D11)、小鼠 IgG1-PE 同种型对照和抗-人 NKG2D-PE(克隆 ON72)。然后裂解血液,并用 BD FACS 裂解/固定溶液和 PBS 固定和洗涤,在 LSRII 流式细胞仪上测定 PE 偶联抗体的结合。利用 FSC/SSC 鉴定非粒细胞。

[0200] 如图 14 的流式细胞术分析所示,观察到抗-小鼠 NKG2D-PE 抗体(克隆 CX5)与沙鼠血液中的 NK 细胞发生剂量依赖性结合。这种结合有特异性,因为同种型对照抗体(大鼠 IgG1-PE 同种型对照(R3-34)和小鼠 IgG1-PE 同种型对照(MOPC-21))或抗-人 NKG2D 抗体(克隆 1D11 和克隆 ON72)没有结合。

[0201] 结果表明,靶向 NKG2D 可用于治疗 2 型糖尿病和高血糖。

[0202] 材料和方法

[0203] 小鼠模型和人患者:基于 C56BL/6 背景的 ApoE^{-/-}小鼠购自杰克逊实验室公司(Jackson Lab)。Klrl1^{-/-}小鼠如前所述。通过杂交 ApoE^{-/-}和 Klrl1^{-/-}小鼠和幼鼠互交产生 Klrl1^{-/-} ApoE^{-/-}小鼠。为了加速动脉粥样硬化,让六周龄雄性鼠任意进食西方饮食或对其注射链脲霉素(STZ)以诱导糖尿病(Park 等, Nat Med, 4:1025-1031(1998)),开始治疗后 8-10 周进行分析。在 NKG2D 抗体阻断实验中,对 ApoE^{-/-}小鼠注射单克隆 NKG2D 抗体(克隆 MI-6, 大鼠 IgG2a)(Jamieson 等, Immunity, 17:19-29(2002)),一周零三天后,给予 STZ,然

后每周给予,持续八周(200 微克 / 第一次注射和 100 微克 / 后续注射)。

[0204] 抗体和试剂:内部制备 NKG2D 抗体(克隆 MI-6)。泛 Rae-1 抗体购自 R&D 系统公司(R&D Systems),而其他抗体来自 BD 生物科学公司(BD Biosciences)或电子生物科学公司(eBioscience)或如下文相关章节所述。

[0205] 正面油红 O 染色:打开不同处理的小鼠的主动脉,用 10%福尔马林固定,用油红 O 染料染色。根据染色主动脉的数码照片,用 Adobe Photoshop 计算油红 O 染色阳性斑块区大小。

[0206] 免疫组化染色:用多克隆山羊抗小鼠 Rae-1 或 H60 抗体(R&D 系统公司和圣克鲁兹生物技术公司)对小鼠主动脉斑块的冰冻切片染色,然后用辣根过氧化物酶(HRP)偶联的驴抗山羊 IgG 抗体和 ABC-HRP 染色系统(棕色)(圣克鲁兹生物技术公司)染色。还用单克隆大鼠抗小鼠 CD68 抗体(Serotec)进行切片染色,接着用碱性磷酸酶(AP)偶联的驴抗大鼠抗体和 ABC-AP 染色试剂盒进行染色(蓝色)(载体实验室公司(Vector Laboratory))。人主动脉斑块的相邻冰冻切片用单克隆小鼠抗人 MICA/B 抗体(克隆 6D4,电子生物科学公司)、抗 -Mac-3 或抗 -CD31 抗体染色。

[0207] 细胞分离:按照已报道的方法,由主动脉或肝脏分离单核细胞、内皮细胞和肝细胞。对分离的细胞进行计数,并用于各种分析。

[0208] 流式细胞术:用荧光标记抗体的适当组合对细胞进行染色,用流式细胞仪 FC500(贝克曼计数器公司(Beckman Counter))通过流式细胞术进行分析。

[0209] 半定量和实时 RT-PCR 分析:通过半定量放射性或实时 RT-PCR 分析 RNA 中的 Rae-1 δ 、Rae-1 ϵ 和 H60b 转录物。

[0210] 巨噬细胞的体外治疗:在含 oxLDL(10 μ g/ml)、天然 LDL(nLDL)(10 μ g/ml)、AGE(200 μ g/ml)或 LPS(200ng/ml)的培养基中体外培养腹膜巨噬细胞 2 天,并分析 NKG2D 配体的表达。

[0211] 总 Rae-1 蛋白的蛋白质印迹分析:裂解巨噬细胞,在 PAGE 凝胶上分离,转移到 PEGF 膜上,用抗 -Rae1 抗体(C20,圣克鲁兹生物技术公司)印迹,用 SEL 系统显色。

[0212] 血清细胞因子的多重分析:在小鼠促炎 7 重试剂盒(IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、IL-12p70、IL-10、IL-1 β 和 KC/CXCL1)(马里兰州盖瑟斯堡的美索发现公司)上直接分析小鼠血清。

[0213] 评估血清中的胆固醇和甘油三酯水平:用 VetTest®化学分析仪(缅因州 IDEXX 实验室公司(IDEXX Laboratories, Inc., Maine))分析胆固醇和甘油三酯水平。

[0214] ALT 活性分析:利用得克萨斯州奥斯汀的生物科学公司(Bioo Scientific, Austin, TX)的试剂盒,按照生产商说明书测定血清中的 ALT 活性。

[0215] 肝脏外植体的离体真培养:从饲喂西方饮食的 ApoE^{-/-}或 Klrk1^{-/-} ApoE^{-/-}小鼠中切除 PBS-灌注的肝脏。将相同重量的切除肝脏切成大约 1mm³的方块,在培养基中培养 1 或 3 天。回收培养基,通过 ELISA 分析细胞因子。

[0216] 胞内细胞因子染色:从肝脏分离的单核细胞在含有 BFA(brofeldin A)的培养基中培养过夜,按照生产商说明书通过胞内细胞因子染色在免疫细胞门选亚组中分析 IL-6、IFN- γ 和 IL-4 的产生(电子生物科学公司和生物传奇公司(Biolegend))。

[0217] ELISA 检测可溶性 MICA:利用 ELISA 试剂盒(明尼苏达州明尼阿波利斯的 R&D 系

- 统公司 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 测定 2 型糖尿病和癌症患者血清中的 MICA 蛋白。
- [0218] 统计学分析:所有数据均表示为平均值 ± 标准误。用双尾斯氏 T 检验确定统计学显著性。P < 0.05 被认为具有统计学显著性。
- [0219] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利均通过引用纳入本文,就好像单独和特别说明将每篇参考文献通过引用纳入本文并全文列入本文那样。
- [0220] 所有可能的变型中上述要素的任意组合包括在本发明范围内,除非本文另有说明或者与上下文明显矛盾。
- [0221] 描述本发明的上下文中使用的术语“一”、“一个”、“所述”等类似表达应解释为涵盖单数和复数,除非本文另有说明或者与上下文明显矛盾。
- [0222] 除非另有说明,本文涉及的任何和所有实施例,或者示例性的语言(如,“例如”)的使用仅仅是为了更好地阐述本发明,而不是对本发明范围构成限制。说明书中的所有语言都不应视作指示本发明实践必需的元素,除非另有明确说明。
- [0223] 涉及一个或多个元素时,采用术语例如“包含”、“具有”、“包括”或“含有”描述本发明的任何方面或实施方式旨在为“由该特定的一个或多个元素组成”、“主要由该特定的一个或多个元素组成”或“基本包含该特定的一个或多个元素”的本发明相似方面或实施方式提供支持,除非上下文中另有说明或有明显矛盾(如本文所述的组合物包含一种特定元素应理解为也描述了该组合物由该元素构成,除非上下文中另有说明或有明显矛盾)。
- [0224] 本发明包括本文所述各个方面或权利要求的主题内容的所有修饰形式或等同形式,至适用法律所许可的最大程度。
- [0225] 示范性实施方式
- [0226] 以下是本发明的示范性实施方式。
- [0227] 1. 一种治疗 2 型糖尿病的方法,所述方法包括给予需要的对象治疗有效量的抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂。
- [0228] 2. 一种治疗 2 型糖尿病的方法,所述方法包括给予需要的对象治疗有效量的阻断 NKG2D 配体结合相互作用的药剂。
- [0229] 3. 一种治疗可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症的方法,所述方法包括给予需要的对象治疗有效量的抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂,其中所述病症选自 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和代谢功能障碍相关疾病。
- [0230] 4. 一种治疗可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症的方法,所述方法包括给予需要的对象治疗有效量的阻断 NKG2D 配体结合相互作用的药剂,其中所述病症选自 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和代谢功能障碍相关疾病。
- [0231] 5. 如实施方式 3 或 4 所述的方法,其特征在于,所述病症是 2 型糖尿病。
- [0232] 6. 如实施方式 3 或 4 所述的方法,其特征在于,所述病症是心血管病。
- [0233] 7. 如前述实施方式中任一项所述的方法,其特征在于,所述对象是人。
- [0234] 8. 如前述实施方式中任一项所述的方法,其特征在于,所述药剂选自可溶性 NKG2D、特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段、NKG2D 配体和 NKG2D 配体活性或表达的抑制剂。
- [0235] 9. 如实施方式 8 所述的方法,其特征在于,所述药剂是特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段。

[0236] 10. 如实施方式 9 所述的方法,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段是人或人源化的。

[0237] 11. 如实施方式 9 所述的方法,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段结合人 NKG2D (hNKG2D)。

[0238] 12. 如实施方式 9 所述的方法,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段降低 NKG2D 介导的 NKG2D 表达细胞的激活或信号转导。

[0239] 13. 如实施方式 9-12 中任一项所述的方法,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段与至少一种 NKG2D 配体竞争结合 NKG2D。

[0240] 14. 如实施方式 13 所述的方法,其特征在于,所述 NKG2D 配体是 MICA/B。

[0241] 15. 如前述实施方式中任一项所述的方法,其特征在于,所述药剂给予导致所述对象出现下述反应中至少一种:血糖水平降低、葡萄糖耐受提高、胰岛素抗性降低、体重降低、血压降低、炎症减轻或代谢功能障碍减轻。

[0242] 16. 如前述实施方式中任一项所述的方法,其特征在于,所述药剂经静脉内、腹膜内或皮下途径给予。

[0243] 17. 如前述实施方式中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法还包括给予至少一种选自下组的额外药剂:抗糖尿病药、抗肥胖药、食欲调节药、抗高血压药、治疗和/或预防糖尿病导致或与糖尿病相关的并发症的药剂、和治疗和/或预防肥胖导致或与肥胖相关的并发症和失调的药剂。

[0244] 18. 如实施方式 17 所述的方法,其特征在于,所述额外药剂选自:(a) 选自下组的降血糖药:GLP1 和 GLP-1 衍生物和类似物、重组促胰岛素分泌肽 (Exendin)-4 和重组促胰岛素分泌肽 -4 衍生物和类似物、糊精和糊精衍生物和类似物、磺脲、双胍、氯茴苯酸(如那格列奈和瑞格列奈)、葡萄糖苷酶抑制剂、DPP-IV(二肽基肽酶-IV)抑制剂、SGLT2 抑制剂、SGLT1 抑制剂或激动剂、胃泌素和胃泌素类似物和衍生物、FGF-21(成纤维细胞生长因子 21)和 FGF-21 衍生物和类似物、质子泵抑制剂如兰索拉唑、奥美拉唑、右旋兰索拉唑、艾美拉唑、泮托拉唑和雷贝拉唑、RXR 激动剂、考来烯胺、考来替泊、普罗布考、右旋甲状腺素、PPAR 激动剂、脂连蛋白和脂连蛋白衍生物和类似物;(b) 选自下组的降血脂剂或脂质代谢调节剂:抗高血脂药、HMG CoA 抑制剂(他汀类)如洛伐他汀、帕伐他汀和斯伐他汀,以及贝特类药物如吉非贝齐和氯贝丁酯;(c) 选自下组的降低食物摄入或提高能量消耗的药剂:NPY(神经肽 Y)拮抗剂、PYY(多肽 YY)激动剂、PP(胰多肽)激动剂、Y2 受体激动剂、Y4 受体激动剂、混合的 Y2/Y4 受体激动剂、MC4(黑皮质素 4)激动剂、阿立新拮抗剂、胰高血糖素和胰高血糖素衍生物和类似物、CRF(促肾上腺皮质激素释放因子)激动剂、CRF BP(促肾上腺皮质激素释放因子结合蛋白)拮抗剂、尿皮质素激动剂、 β 3 激动剂、MSH(促黑色素细胞激素)激动剂、MCH(黑色素细胞聚集激素)拮抗剂、CCK(胆囊收缩素)激动剂、血清素再摄取抑制剂、血清素和去甲肾上腺素再摄取抑制剂、混合的血清素和去甲肾上腺素能化合物、5HT(血清素)激动剂、铃蟾肽激动剂、甘丙肽拮抗剂、生长激素、生长激素释放化合物、TRH(促甲状腺激素释放激素)激动剂、UCP 2 或 3(非偶联的蛋白质 2 或 3)调节剂、瘦激素激动剂、DA 激动剂(溴隐亭、多普辛(doprexin))、脂肪酶/淀粉酶抑制剂、RXR(类视黄醇 X 受体)调节剂、组胺 H3 拮抗剂和 CART(可卡因安非他明调节的转录物)激动剂;和(d) 选自下组的降血压药: β -阻断剂如阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吡洛洛尔、普萘洛尔和

美托洛尔, ACE(血管紧张素转化酶)抑制剂如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、阿拉普利(alatriopril)、喹那普利和雷米普利, 钙通道阻断剂如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔硫卓和维拉帕米, 以及 α -阻断剂如多沙唑嗪、乌拉地尔、哌唑嗪和特拉唑嗪。

[0245] 19. 一种组合物, 所述组合物包含治疗有效量的抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂和药学上可接受的运载体。

[0246] 20. 一种组合物, 所述组合物包含治疗有效量的阻断 NKG2D 配体结合相互作用的药剂和药学上可接受的运载体。

[0247] 21. 如实施方式 19 或 20 所述的组合物, 其特征在于, 所述药剂可用于治疗 2 型糖尿病。

[0248] 22. 如实施方式 19 或 20 所述的组合物, 其特征在于, 所述药剂用于治疗可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症。

[0249] 23. 如实施方式 22 所述的组合物, 其特征在于, 所述病症选自 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和代谢功能障碍相关疾病。

[0250] 24. 如实施方式 23 所述的组合物, 其特征在于, 所述病症是 2 型糖尿病。

[0251] 25. 如实施方式 23 所述的组合物, 其特征在于, 所述病症是心血管病。

[0252] 26. 如实施方式 19-25 中任一项所述的组合物, 其特征在于, 所述药剂选自可溶性 NKG2D、特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段、NKG2D 配体和 NKG2D 配体活性或表达的抑制剂。

[0253] 27. 如实施方式 26 所述的组合物, 其特征在于, 所述药剂是特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段。

[0254] 28. 如实施方式 27 所述的组合物, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段是人或人源化的。

[0255] 29. 如实施方式 27 所述的组合物, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段结合人 NKG2D(hNKG2D)。

[0256] 30. 如实施方式 26 所述的组合物, 其特征在于, 所述药剂是 NKG2D 配体活性或表达的抑制剂。

[0257] 31. 如实施方式 30 所述的组合物, 其特征在于, 所述 NKG2D 配体活性或表达的抑制剂是 MICA/B 抑制剂。

[0258] 32. 如实施方式 31 所述的组合物, 其特征在于, 所述 MICA/B 抑制剂是 MICA/B- 特异性 siRNA。

[0259] 33. 如实施方式 19-32 中任一项所述的组合物, 其特征在于, 所述组合物还包括至少一种选自下组的额外药剂: 抗糖尿病药、抗肥胖药、食欲调节药、抗高血压药、治疗和 / 或预防糖尿病导致或与糖尿病相关的并发症的药剂、和治疗和 / 或预防肥胖导致或与肥胖相关的并发症和失调的药剂。

[0260] 34. 如实施方式 33 所述的组合物, 其特征在于, 所述额外药剂选自 (a) 选自下组的降血糖药: GLP1 和 GLP-1 衍生物和类似物、重组促胰岛素分泌肽 (Exendin)-4 和重组促胰岛素分泌肽 -4 衍生物和类似物、糊精和糊精衍生物和类似物、磺脲、双胍、氯茴苯酸 (如那格列奈和瑞格列奈)、葡萄糖苷酶抑制剂、DPP-IV(二肽基肽酶 -IV) 抑制剂、SGLT2 抑制

剂、SGLT1 抑制剂或激动剂、胃泌素和胃泌素类似物和衍生物、FGF-21 (成纤维细胞生长因子 21) 和 FGF-21 衍生物和类似物、质子泵抑制剂如兰索拉唑、奥美拉唑、右旋兰索拉唑、艾美拉唑、泮托拉唑和雷贝拉唑、RXR 激动剂、考来烯胺、考来替泊、普罗布考、右旋甲状腺素、PPAR 激动剂、脂连蛋白和脂连蛋白衍生物和类似物；(b) 选自下组的降血脂剂或脂质代谢调节剂：抗高血脂药、HMG CoA 抑制剂（他汀类）如洛伐他汀、帕伐他汀和斯伐他汀，以及贝特类药物如吉非贝齐和氯贝丁酯；(c) 选自下组的降低食物摄入或提高能量消耗的药剂：NPY (神经肽 Y) 拮抗剂、PYY (多肽 YY) 激动剂、PP (胰多肽) 激动剂、Y2 受体激动剂、Y4 受体激动剂、混合的 Y2/Y4 受体激动剂、MC4 (黑皮质素 4) 激动剂、阿立新拮抗剂、胰高血糖素和胰高血糖素衍生物和类似物、CRF (促肾上腺皮质激素释放因子) 激动剂、CRF BP (促肾上腺皮质激素释放因子结合蛋白) 拮抗剂、尿皮质素激动剂、 β 3 激动剂、MSH (促黑色素细胞激素) 激动剂、MCH (黑色素细胞聚集激素) 拮抗剂、CCK (胆囊收缩素) 激动剂、血清素再摄取抑制剂、血清素和去甲肾上腺素再摄取抑制剂、混合的血清素和去甲肾上腺素能化合物、5HT (血清素) 激动剂、铃蟾肽激动剂、甘丙肽拮抗剂、生长激素、生长激素释放化合物、TRH (促甲状腺激素释放激素) 激动剂、UCP 2 或 3 (非偶联的蛋白质 2 或 3) 调节剂、瘦激素激动剂、DA 激动剂 (溴隐亭、多普辛 (doprexin))、脂肪酶 / 淀粉酶抑制剂、RXR (类视黄醇 X 受体) 调节剂、组胺 H3 拮抗剂和 CART (可卡因安非他明调节的转录物) 激动剂；和 (d) 选自下组的降血压药： β - 阻断剂如阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔和美托洛尔，ACE (血管紧张素转化酶) 抑制剂如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、阿拉普利 (alatriopril)、喹那普利和雷米普利，钙通道阻断剂如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔硫卓和维拉帕米，以及 α - 阻断剂如多沙唑嗪、乌拉地尔、哌唑嗪和特拉唑嗪。

[0261] 35. 一种药盒，所述药盒包括：

[0262] (a) 治疗有效量的抑制 NKG2D 激活或信号转导的药剂以及药学上可接受的运载体；和

[0263] (b) 使用说明书。

[0264] 36. 一种药盒，所述药盒包括：

[0265] (a) 治疗有效量的阻断 NKG2D 配体结合作用的药剂和药学上可接受的运载体；和

[0266] (b) 使用说明书。

[0267] 37. 如实施方式 35 或 36 所述的药盒，其特征在于，所述药剂可用于治疗 2 型糖尿病。

[0268] 38. 如实施方式 35 或 36 所述的药盒，其特征在于，所述药剂用于治疗可通过抑制 NKG2D 来调节或正常化的病症。

[0269] 39. 如实施方式 38 所述的药盒，其特征在于，所述病症选自 2 型糖尿病、心血管病、炎性疾病和代谢功能障碍相关疾病。

[0270] 40. 如实施方式 39 所述的药盒，其特征在于，所述病症是 2 型糖尿病。

[0271] 41. 如实施方式 39 所述的药盒，其特征在于，所述病症是心血管病。

[0272] 42. 如实施方式 35-41 中任一项所述的药盒，其特征在于，所述药剂选自可溶性 NKG2D、特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段、NKG2D 配体和 NKG2D 配体活性或表达的抑制剂。

[0273] 43. 如实施方式 42 所述的药盒,其特征在于,所述药剂是特异性结合 NKG2D 的抗体或其抗原结合片段。

[0274] 44. 如实施方式 43 所述的药盒,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段是人或人源化的。

[0275] 45. 如实施方式 43 所述的药盒,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段结合人 NKG2D (hNKG2D)。

[0276] 46. 如实施方式 35-45 中任一项所述的药盒,其特征在于,所述药盒还包括至少一种选自下组的额外药剂:抗糖尿病药、抗肥胖药、食欲调节药、抗高血压药、治疗和 / 或预防糖尿病导致或与糖尿病相关的并发症的药剂、和治疗和 / 或预防肥胖导致或与肥胖相关的并发症和失调的药剂。

[0277] 47. 如实施方式 46 所述的药盒,其特征在于,所述额外药剂选自 (a) 选自下组的降血糖药:GLP1 和 GLP-1 衍生物和类似物、重组促胰岛素分泌肽 (Exendin)-4 和重组促胰岛素分泌肽 -4 衍生物和类似物、糊精和糊精衍生物和类似物、磺脲、双胍、氯茴苯酸 (如那格列奈和瑞格列奈)、葡糖苷酶抑制剂、DPP-IV (二肽基肽酶 -IV) 抑制剂、SGLT2 抑制剂、SGLT1 抑制剂或激动剂、胃泌素和胃泌素类似物和衍生物、FGF-21 (成纤维细胞生长因子 21) 和 FGF-21 衍生物和类似物、质子泵抑制剂如兰索拉唑、奥美拉唑、右旋兰索拉唑、艾美拉唑、泮托拉唑和雷贝拉唑、RXR 激动剂、考来烯胺、考来替泊、普罗布考、右旋甲状腺素、PPAR 激动剂、脂连蛋白和脂连蛋白衍生物和类似物;(b) 选自下组的降血脂剂或脂质代谢修饰剂:抗高血脂药、HMG CoA 抑制剂 (他汀类) 如洛伐他汀、帕伐他汀和斯伐他汀,以及贝特类药物如吉非贝齐和氯贝丁酯;(c) 选自下组的降低食物摄入或提高能量消耗的药剂:NPY (神经肽 Y) 拮抗剂、PYY (多肽 YY) 激动剂、PP (胰多肽) 激动剂、Y2 受体激动剂、Y4 受体激动剂、混合的 Y2/Y4 受体激动剂、MC4 (黑皮质素 4) 激动剂、阿立新拮抗剂、胰高血糖素和胰高血糖素衍生物和类似物、CRF (促肾上腺皮质激素释放因子) 激动剂、CRF BP (促肾上腺皮质激素释放因子结合蛋白) 拮抗剂、尿皮质素激动剂、 β 3 激动剂、MSH (促黑色素细胞激素) 激动剂、MCH (黑色素细胞聚集激素) 拮抗剂、CCK (胆囊收缩素) 激动剂、血清素再摄取抑制剂、血清素和去甲肾上腺素再摄取抑制剂、混合的血清素和去甲肾上腺素能化合物、5HT (血清素) 激动剂、铃蟾肽激动剂、甘丙肽拮抗剂、生长激素、生长激素释放化合物、TRH (促甲状腺激素释放激素) 激动剂、UCP 2 或 3 (非偶联的蛋白质 2 或 3) 调节剂、瘦激素激动剂、DA 激动剂 (溴隐亭、多普辛 (doprexin))、脂肪酶 / 淀粉酶抑制剂、RXR (类视黄醇 X 受体) 调节剂、组胺 H3 拮抗剂和 CART (可卡因安非他明调节的转录物) 激动剂;和 (d) 选自下组的降血压药: β - 阻断剂如阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吡洛洛尔、普萘洛尔和美托洛尔,ACE (血管紧张素转化酶) 抑制剂如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、阿拉普利 (alatriopril)、喹那普利和雷米普利,钙通道阻断剂如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔硫卓和维拉帕米,以及 α - 阻断剂如 多沙唑嗪、乌拉地尔、哌唑嗪和特拉唑嗪。

[0278] 48. 一种在对象中检测 2 型糖尿病发生倾向或 2 型糖尿病的存在的方法,所述方法包括:

[0279] (a) 从所述对象获取样品;

[0280] (b) 将所述样品与检测是否存在 MICA/B 表达的至少一种试剂相接触;

[0281] (c) 测定所述样品中的 MICA/B 表达水平 ;和 (d) 将 MICA/B 过度表达与所述对象的 2 型糖尿病发生倾向或存在 2 型糖尿病相关联。

[0282] 49. 一种在对象中检测心血管病发生倾向或心血管病的存在的方法,所述方法包括:

[0283] (a) 从所述对象获取样品 ;

[0284] (b) 将所述样品与检测是否存在 MICA/B 表达的至少一种试剂相接触 ;

[0285] (c) 测定所述样品中的 MICA/B 表达水平 ;和

[0286] (d) 将 MICA/B 过度表达与所述对象的心血管病发生倾向或存在心血管病相关联。

[0287] 50. 如实施方式 48 或 49 所述的方法,其特征在于,所述试剂是 MICA/B 抗体。

[0288] 51. 如实施方式 48 或 49 所述的方法,其特征在于,所述样品是血清。

[0289] 52. 如实施方式 48 或 49 所述的方法,其特征在于,所述对象是人。

[0290] 53. 如前述实施方式 48-52 中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法还包括测定所述样品中不是 MICA/B 的心血管病标记物的表达水平,并将心血管病标记物的过度表达或表达不足与所述对象的心血管病发生倾向或存在心血管病相关联。

[0001]

序列表

<110> 宾州研究基金会和加利福尼亚大学董事会
 <120> 检测和治疗异常代谢疾病和心血管病的组合物、方法和药盒/试剂盒
 <130> P025-0001PCT
 <141> 2010-08-16
 <150> US 61/234,425
 <151> 2009-08-17
 <150> 61/304,113
 <151> 2010-02-12

 <160> 40
 <170> PatentIn 3.5 版

 <210> 1
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Pro Leu Asp Tyr Arg Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

[0002]

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser

[0003]

405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445
<210> 2		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 2		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp		
	20	25
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Gly Tyr Pro Tyr		
	85	90
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
	165	170
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205

[0004]

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 3
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

[0005]

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445

Lys

<210> 4
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

[0006]

20	25	30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu 35 40 45		
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60		
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu 65 70 75 80		
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro 85 90 95		
Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala 100 105 110		
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser 115 120 125		
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu 130 135 140		
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser 145 150 155 160		
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu 165 170 175		
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val 180 185 190		
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys 195 200 205		
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210 215		
<210> 5		
<211> 121		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 5		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly 1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20 25 30		
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		

[0007]

Ser Ser Ile Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Arg Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Pro Leu Asp Tyr Arg Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Gly Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 7
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

[0008]

1 5

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10
 Ser Ile Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 11
 Asp Arg Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Pro Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 12
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 14
 Gln Gln Tyr Asn Gly Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT

[0010]

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 15

Asp Tyr Gly Met Thr

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 16

Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 17

Glu Arg Glu Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val

1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 19

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 20

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Thr

1 5

[0011]

<210> 21
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 21
 Gln Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Asp Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Asn Trp Asp Asp Ala Phe Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

[0012]

245	250	255
Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp 260	265	270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 275	280	285
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 290	295	300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 305	310	315
Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 325	330	335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu 340	345	350
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 355	360	365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 370	375	380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 385	390	395
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn 405	410	415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 420	425	430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys 435	440	
<210> 22		
<211> 215		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 22		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser 20	25	30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu 35	40	45

[0013]

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 23
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 23
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Asn Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Trp Val Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr

[0014]

65	70	75	80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	85	90	95
Gly Arg Leu Thr Met Phe Arg Gly Ile Ile Ile Gly Tyr Phe Asp Tyr	100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly	115	120	125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser	130	135	140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val	145	150	155
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe	165	170	175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val	180	185	190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val	195	200	205
Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys	210	215	220
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly	225	230	235
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu	260	265	270
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His	275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg	290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys	305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu	325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	340	345	350

[0015]

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 24
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 24
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

[0016]

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 25

<211> 115

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 25

Gln Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Asp Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Asn Trp Asp Asp Ala Phe Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 26

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 26

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0017]

1	5	10
<210> 38		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 38		
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala		
1	5	10
<210> 39		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 39		
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr		
1	5	
<210> 40		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 40		
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr		
1	5	

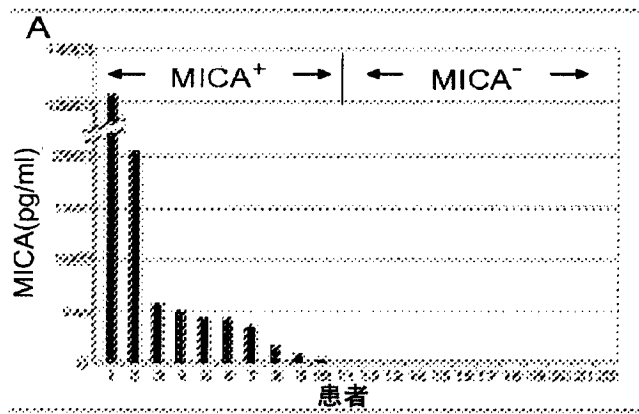


图 1A

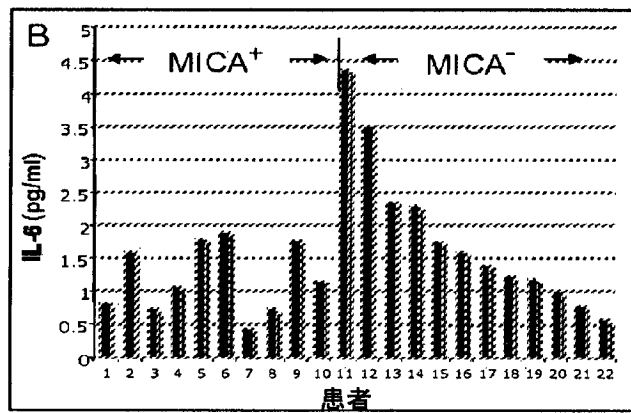


图 1B

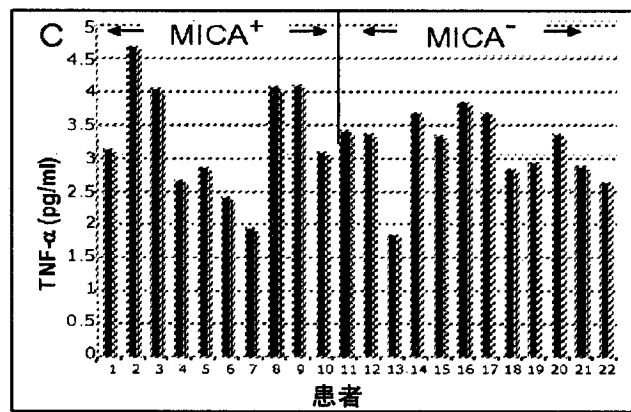


图 1C

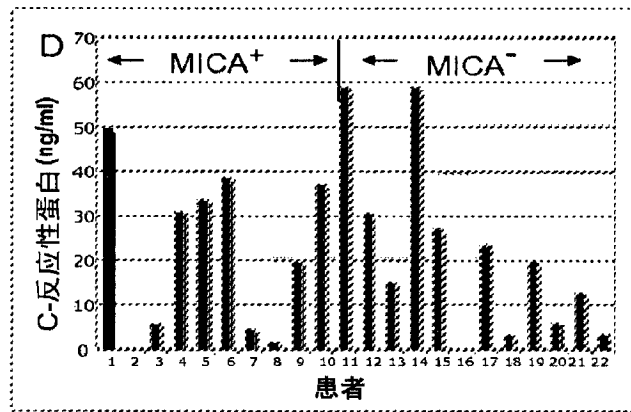


图 1D

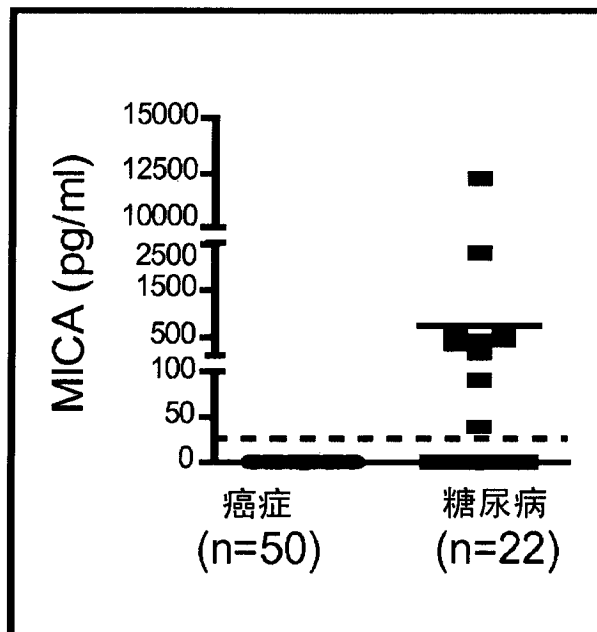


图 1E

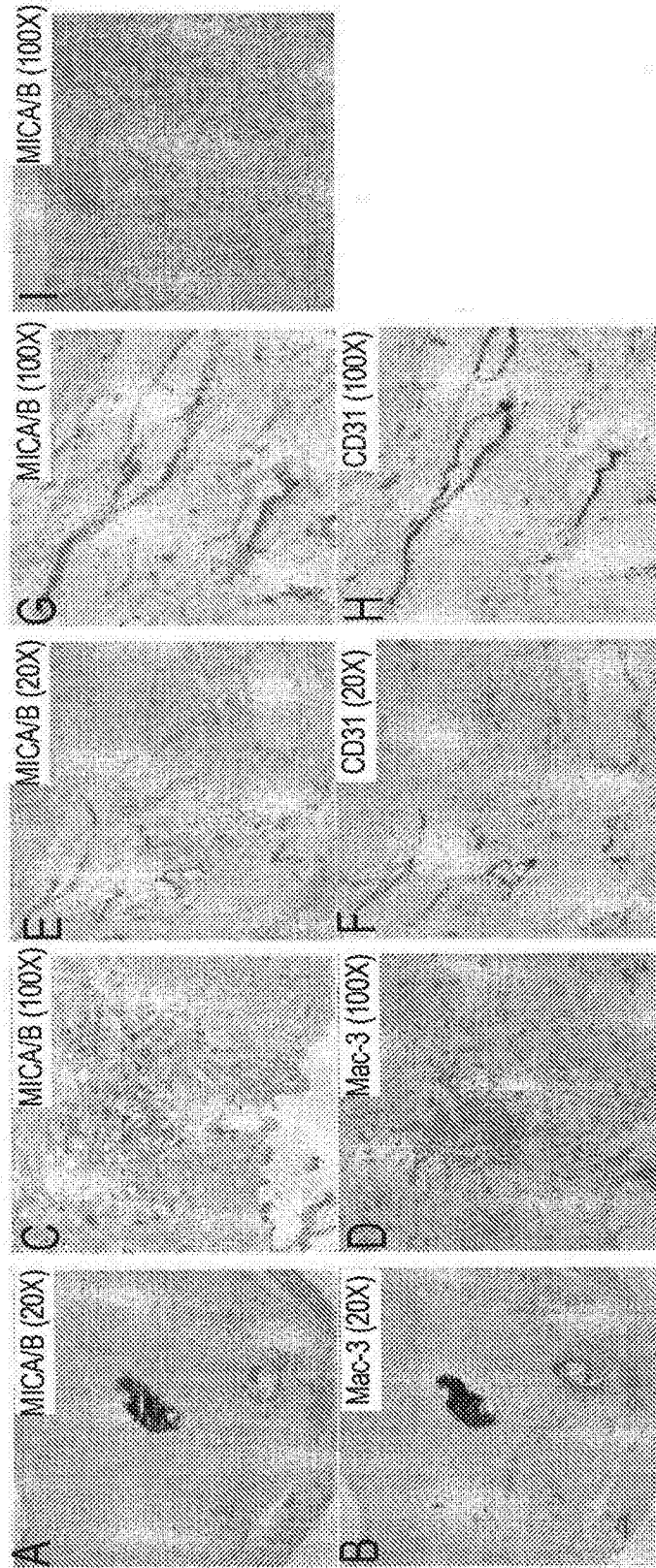


图 2

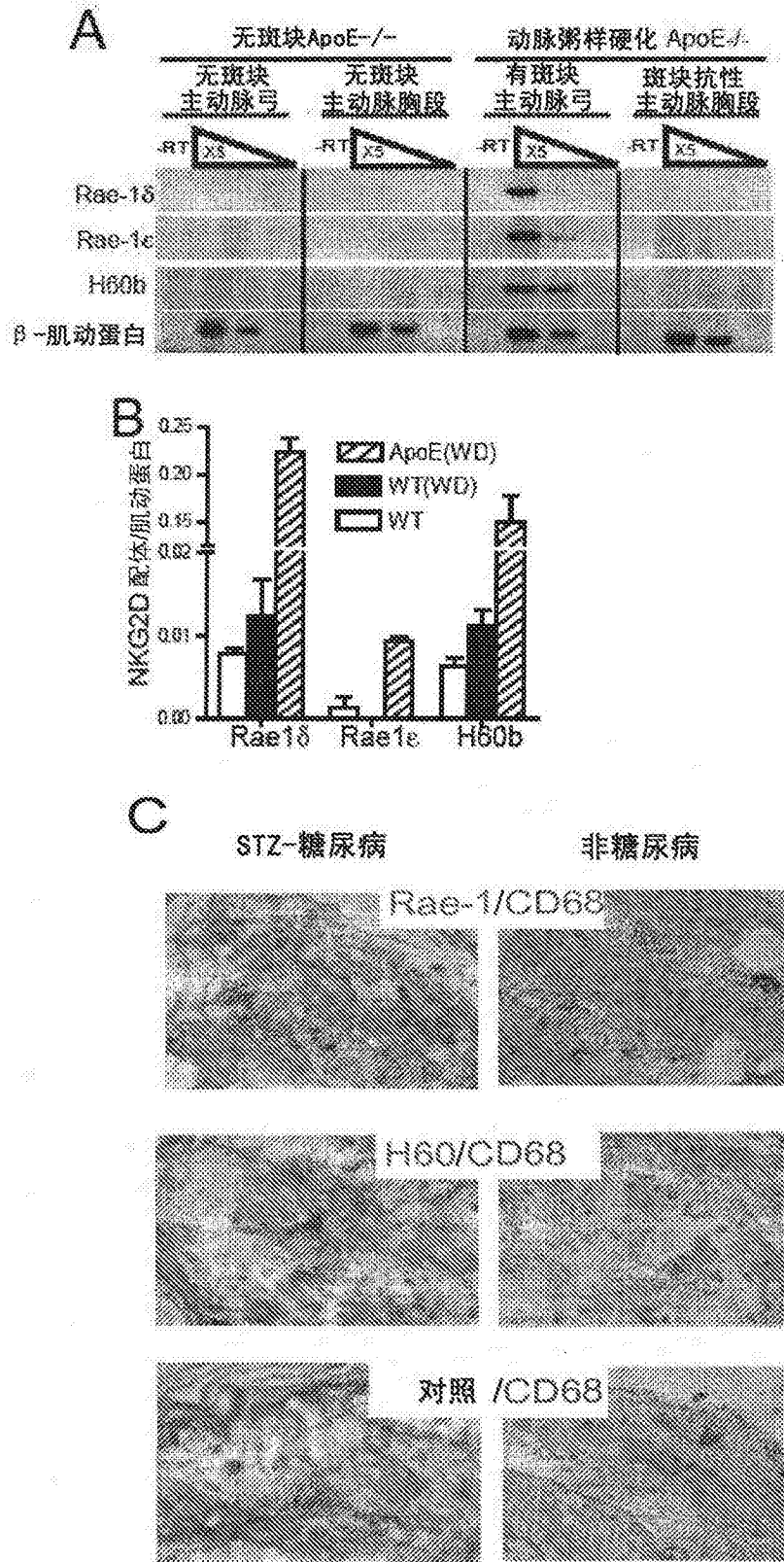


图 3

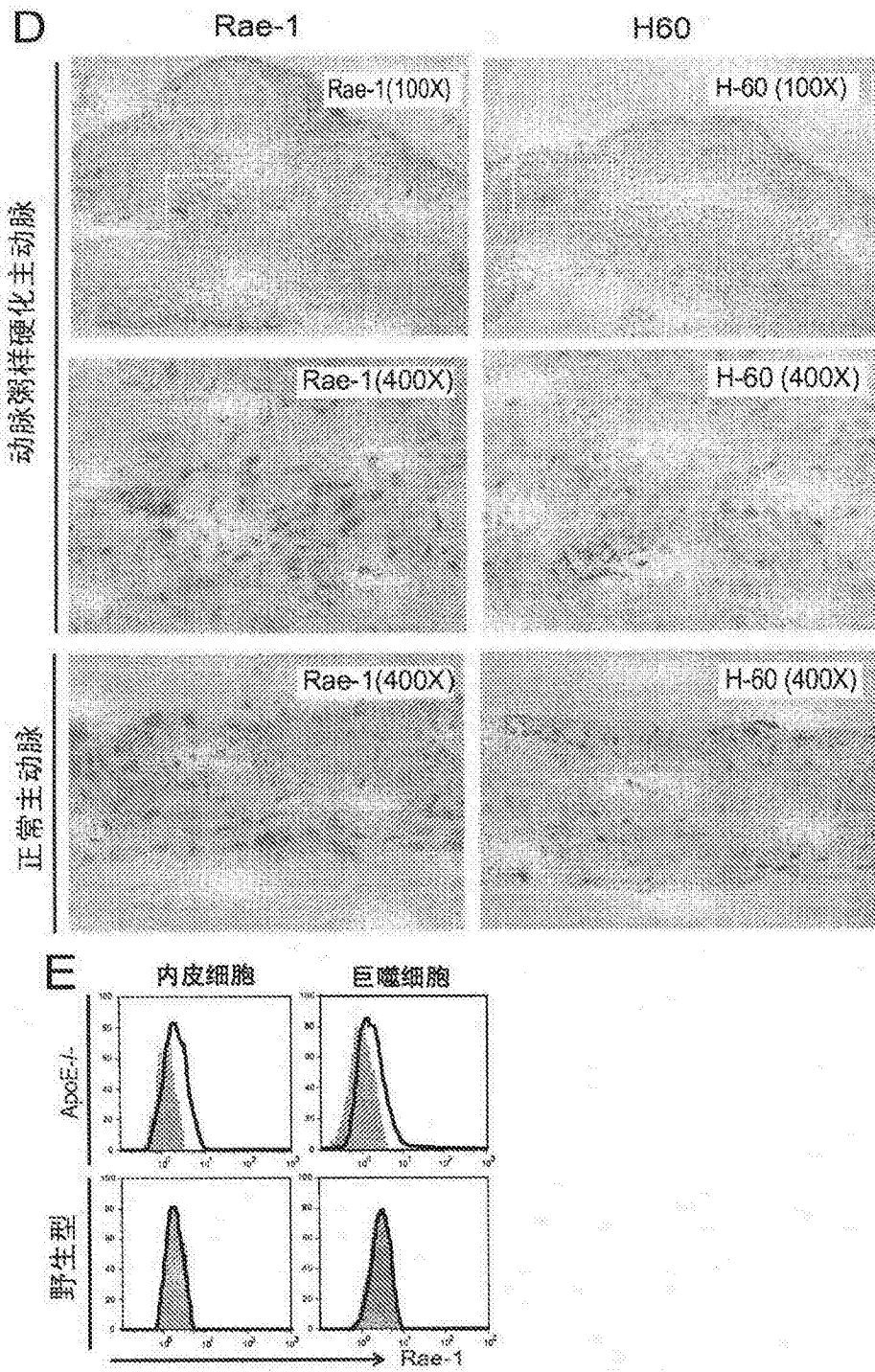


图 3

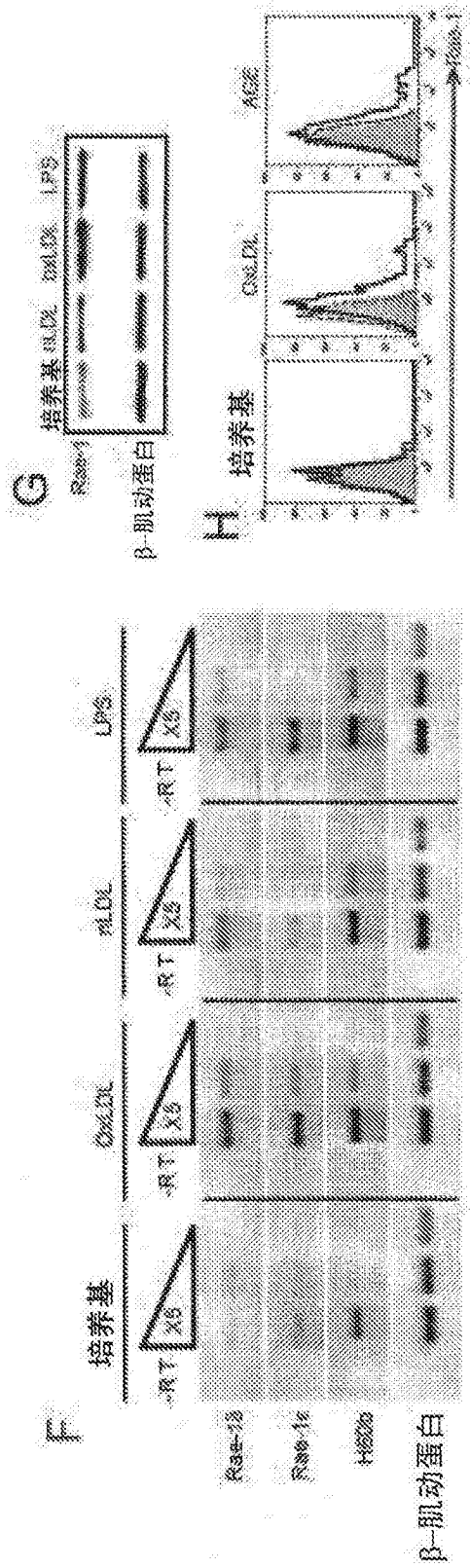


图 3

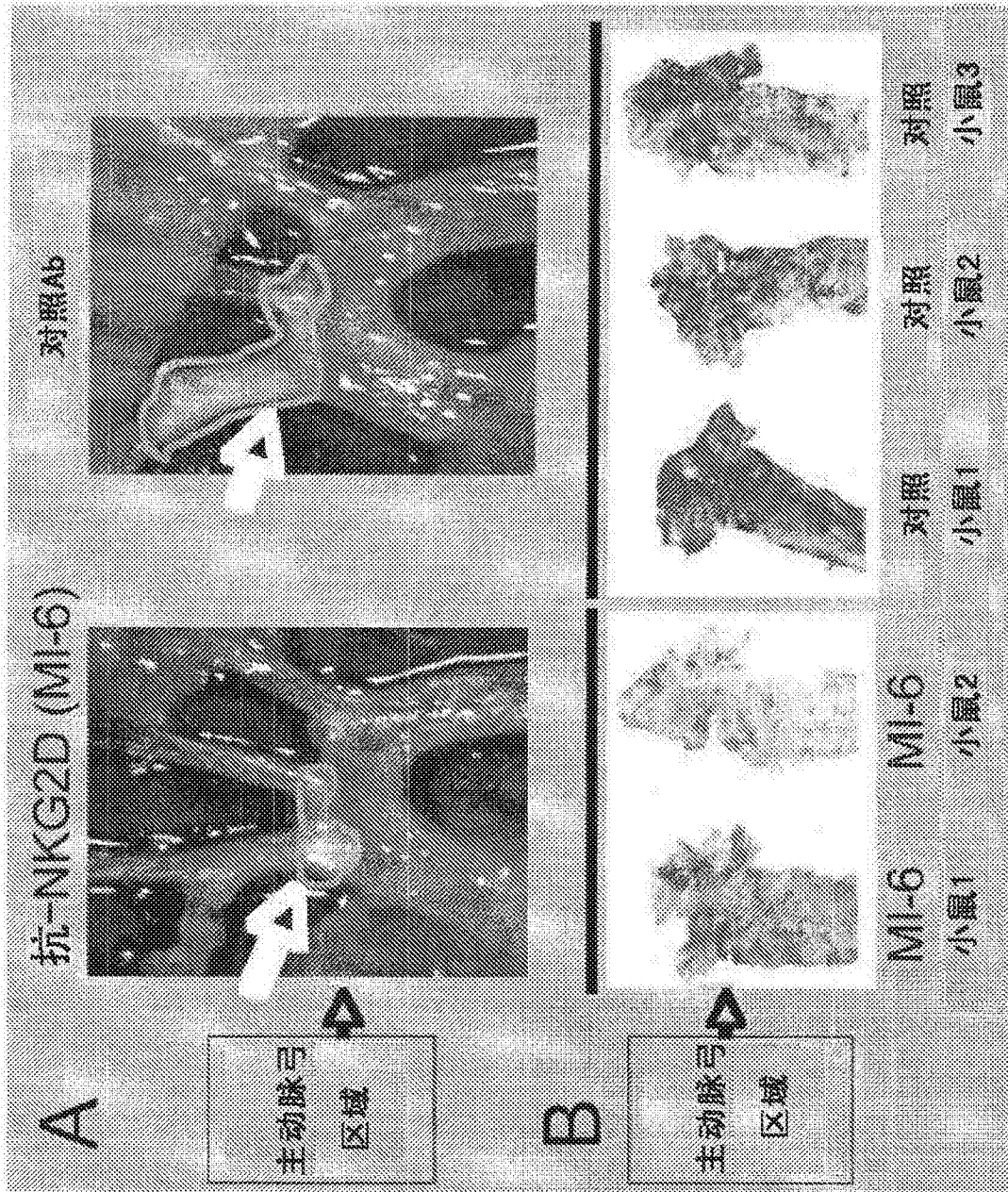


图 4

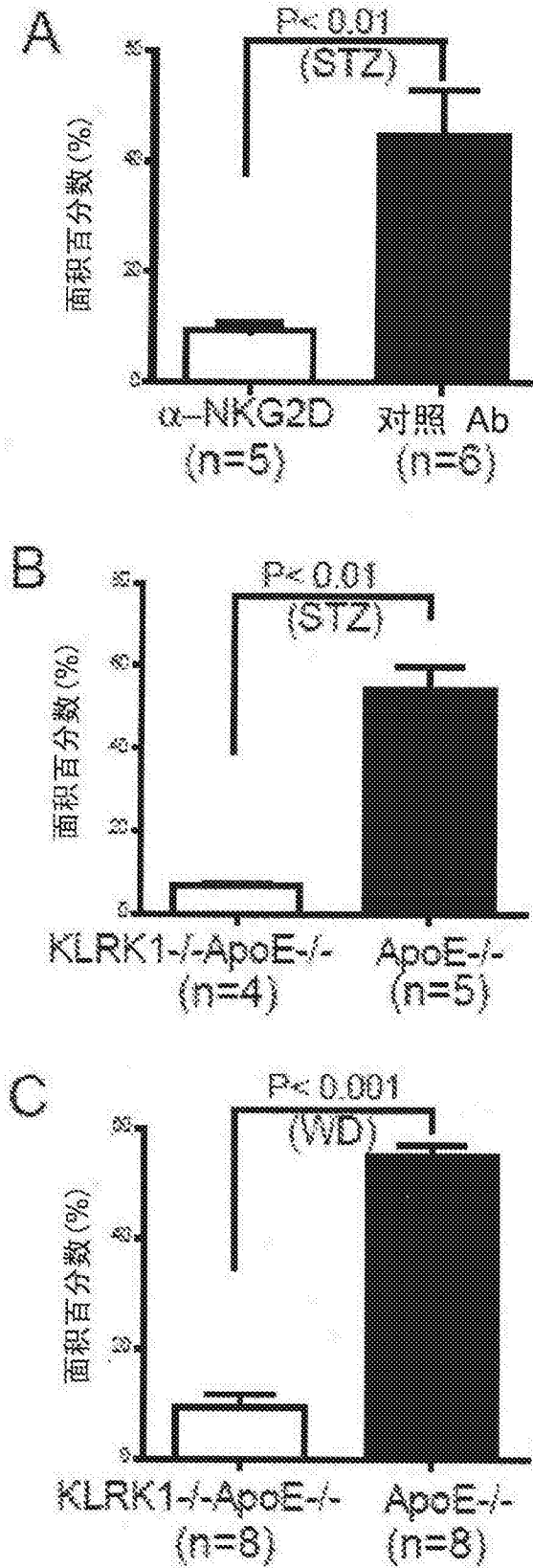


图 5

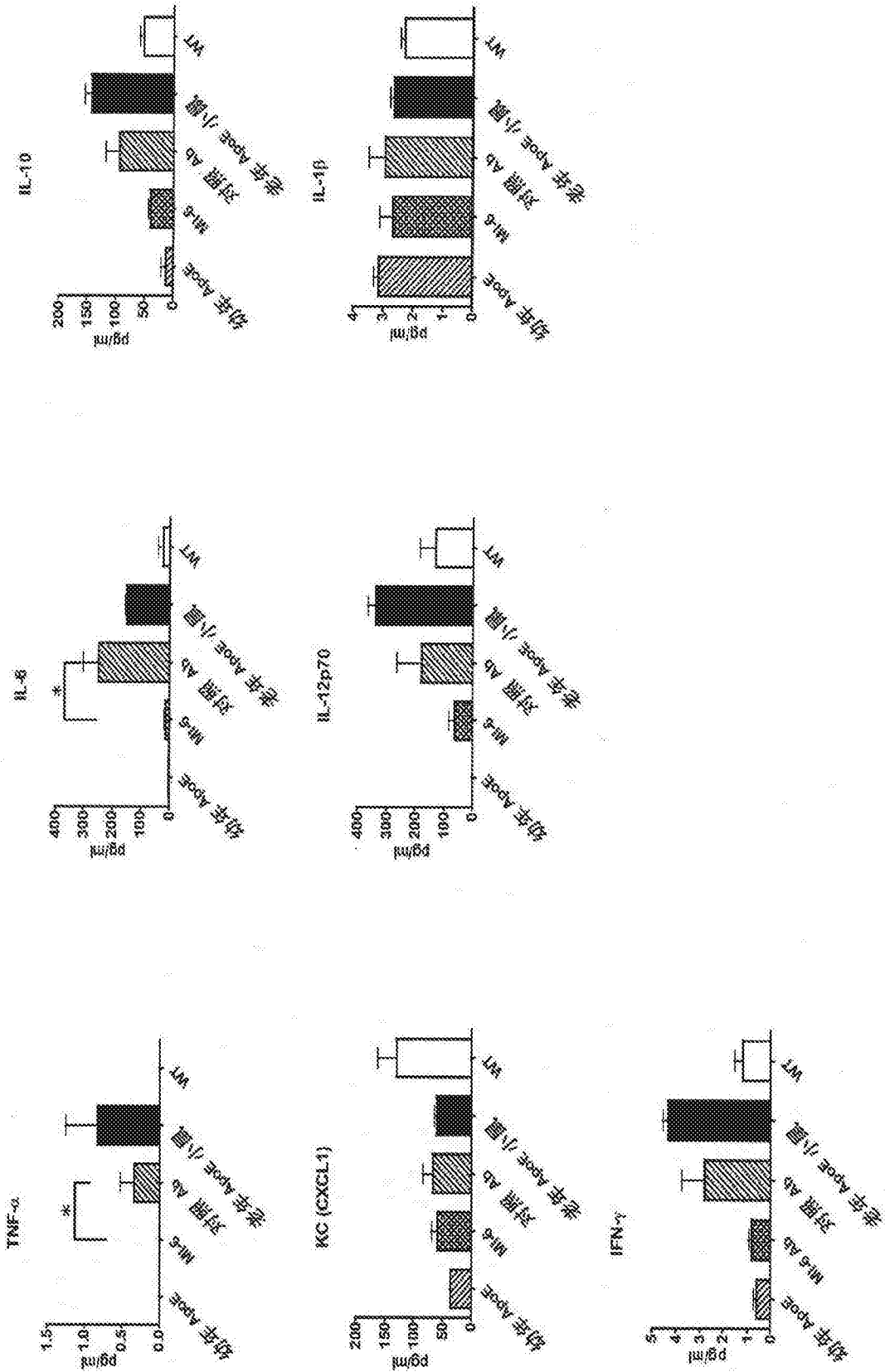


图 6

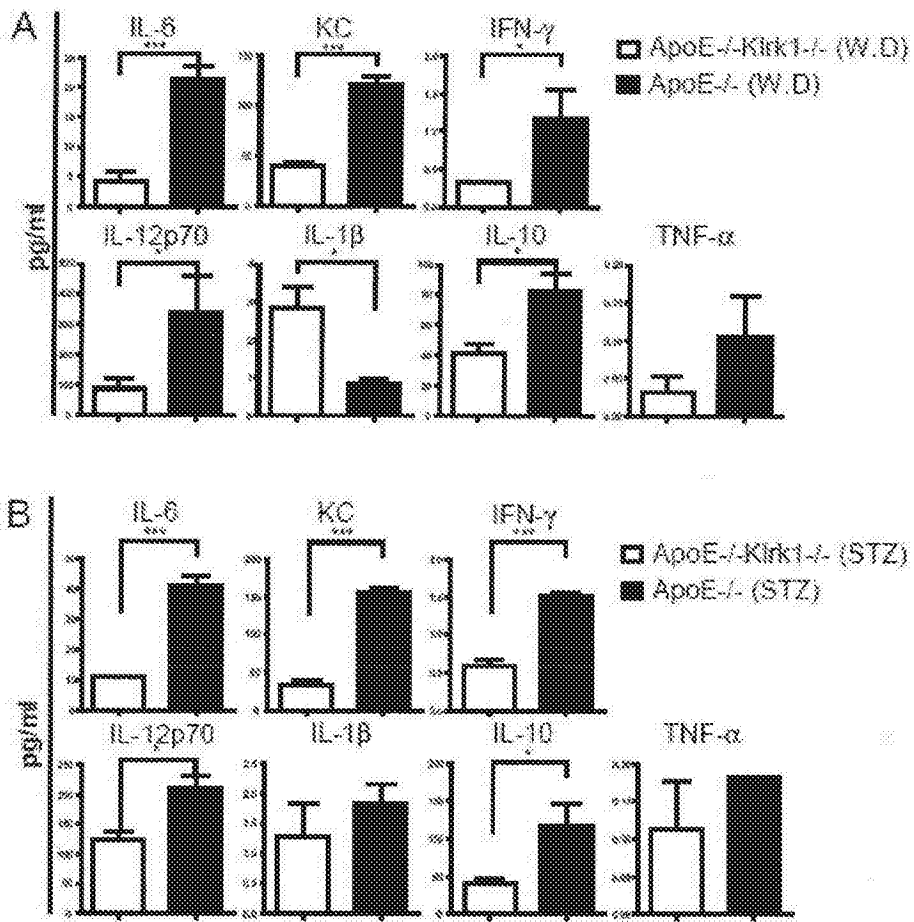


图 7

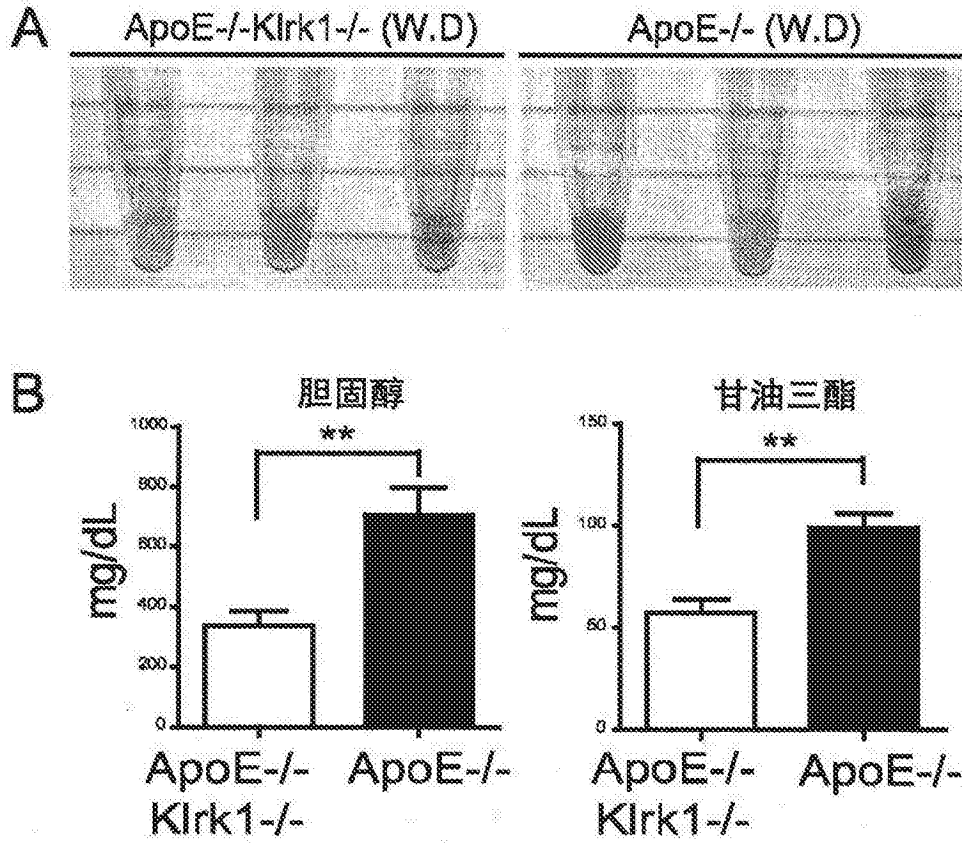


图 8

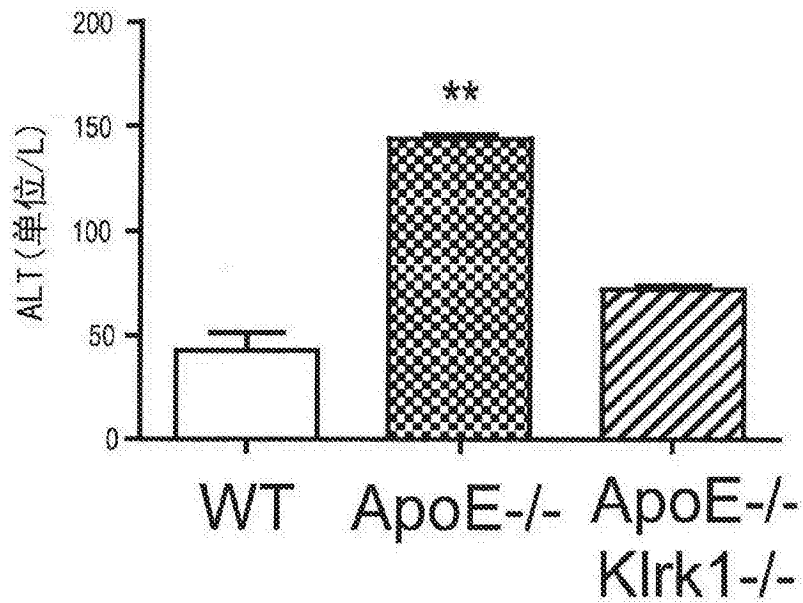


图 9

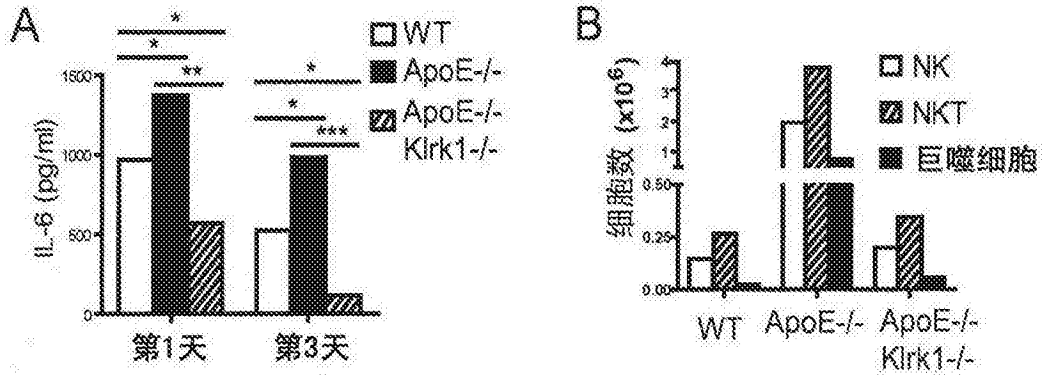


图 10

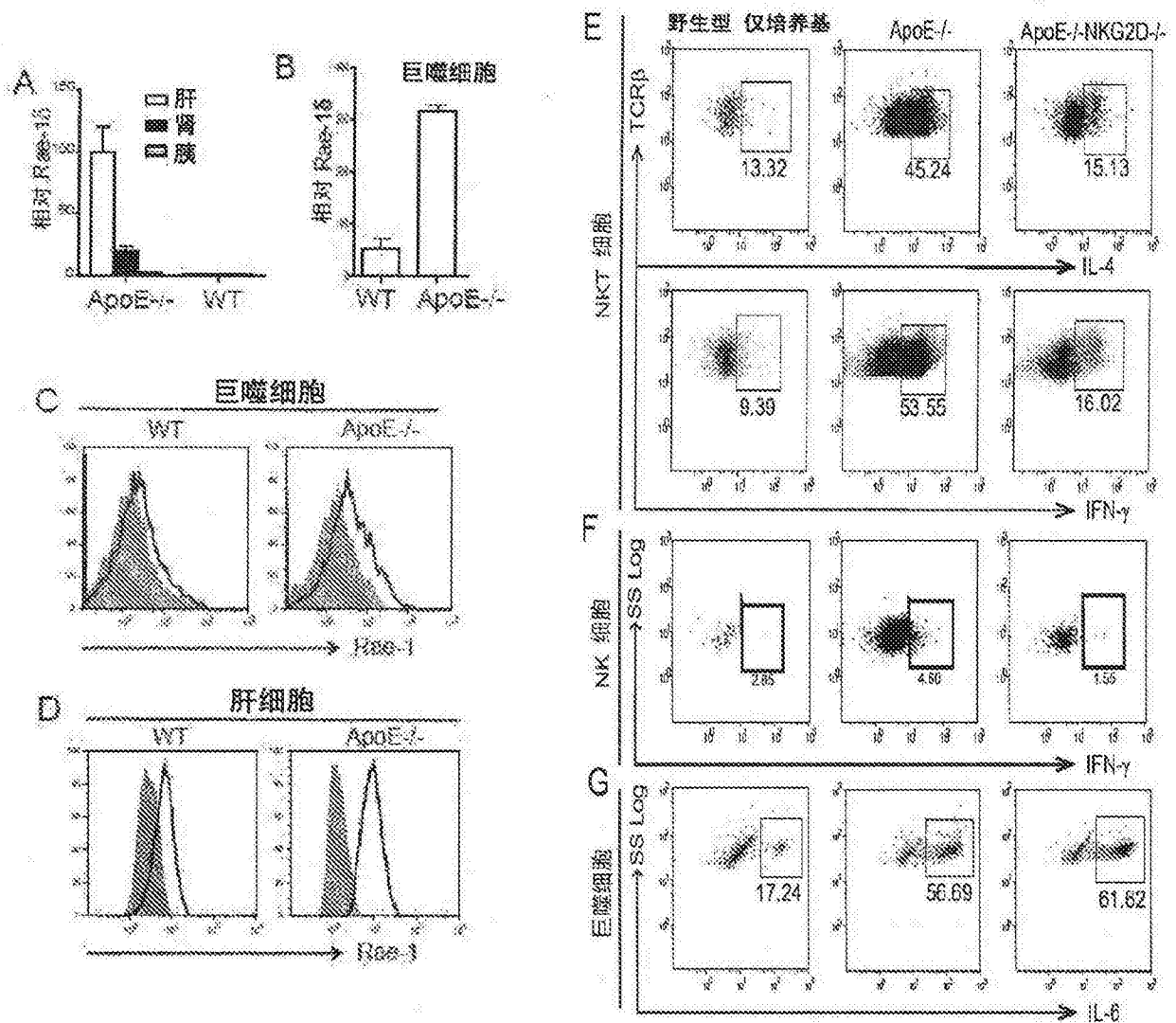


图 11

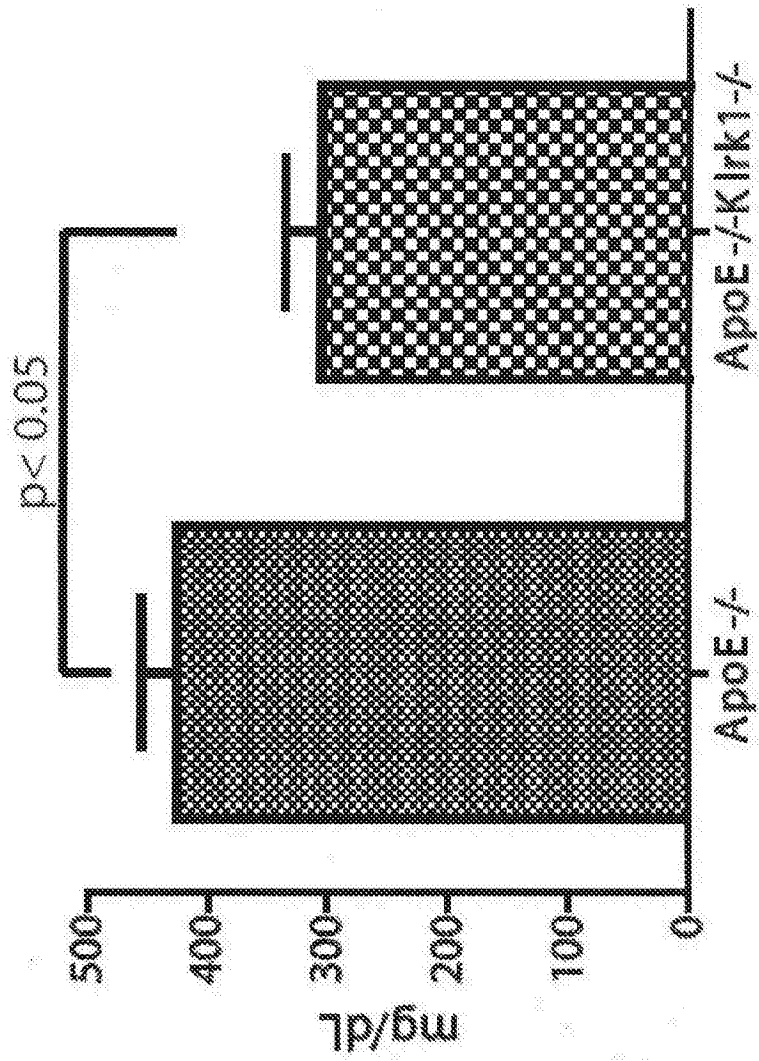


图 12

在肥沙鼠中NKG2D抗体对糖尿病发生的影响

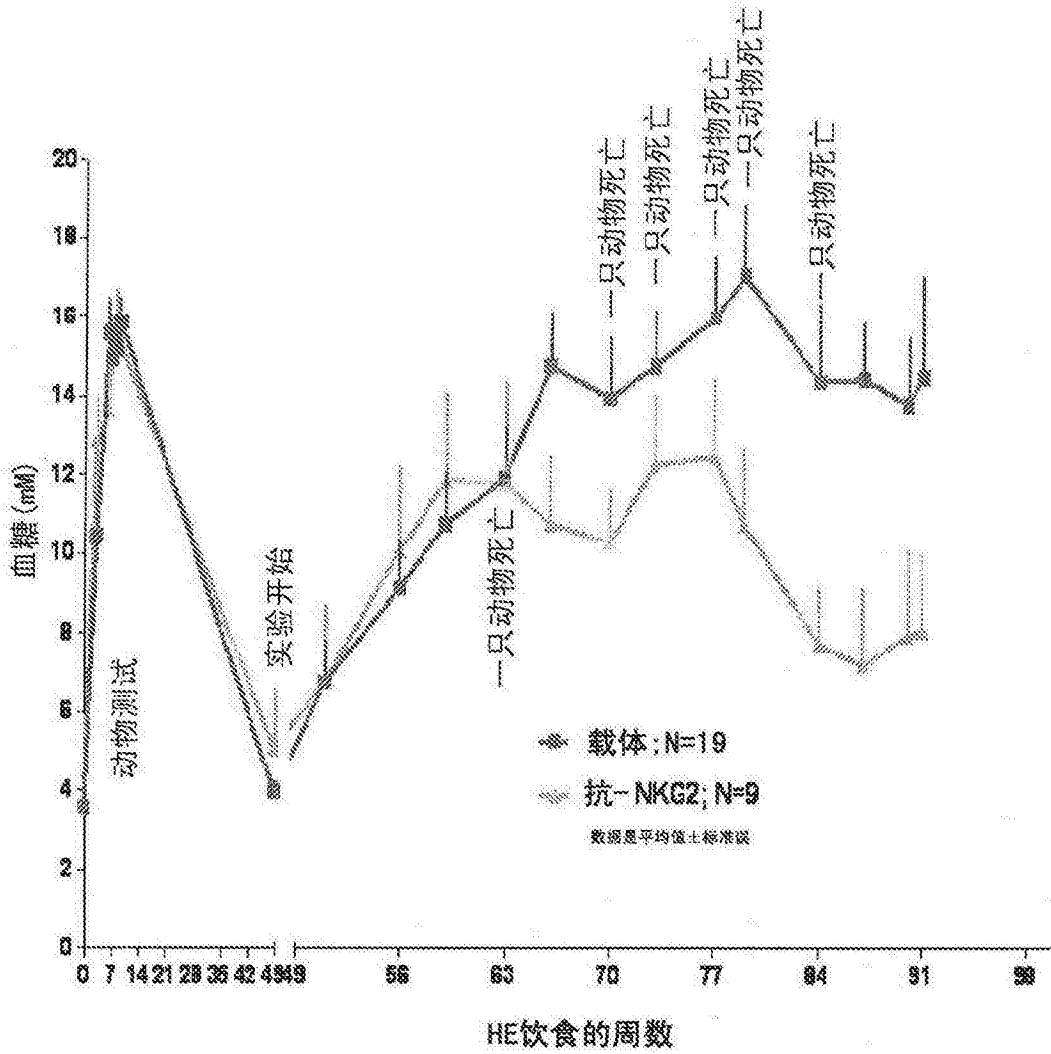


图 13

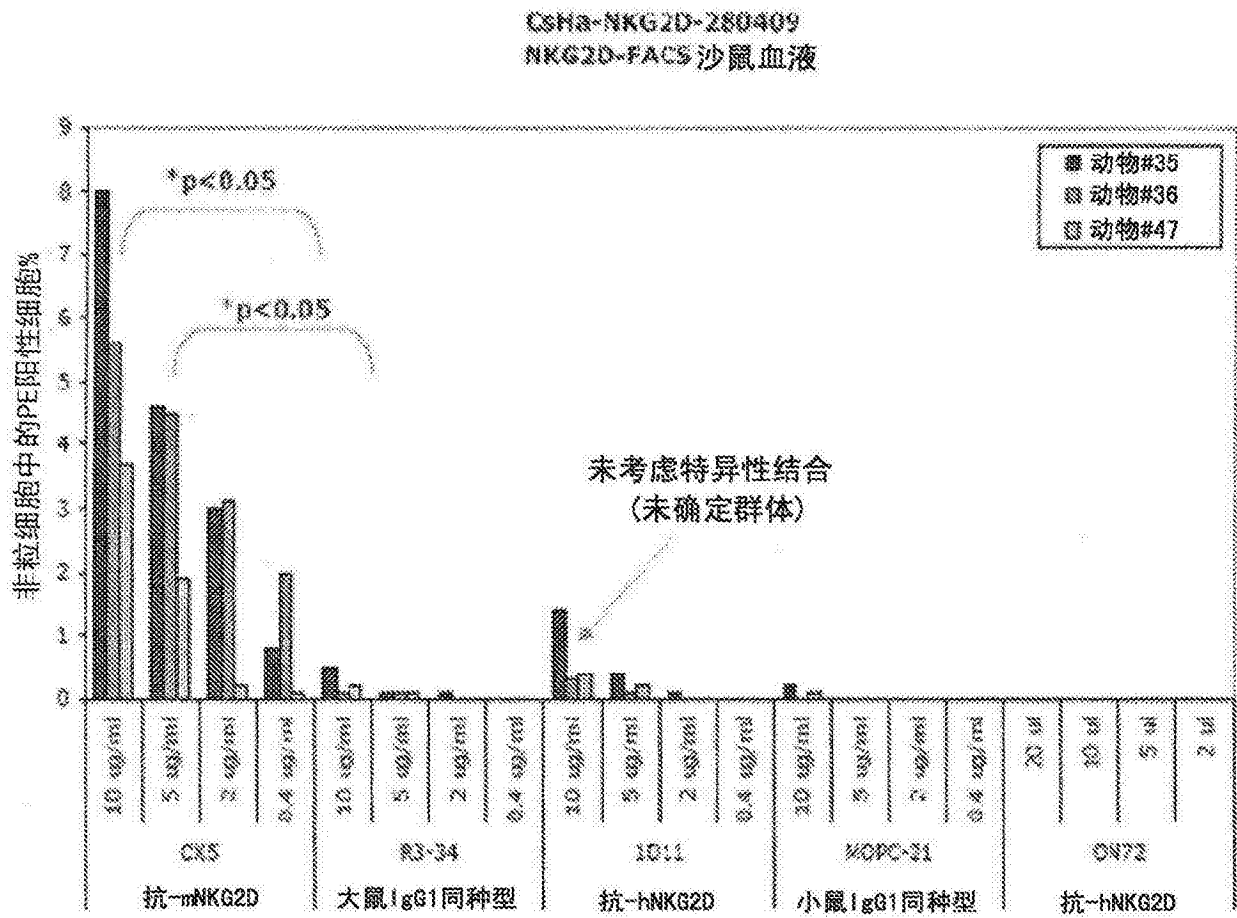


图 14