



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116322766 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 23

(21) 申请号 202180056349.5

(22) 申请日 2021.06.22

(30) 优先权数据

63/042,844 2020.06.23 US

63/135,381 2021.01.08 US

63/182,095 2021.04.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2023.02.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/066989 2021.06.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/259927 EN 2021.12.30

(71) 申请人 泽拉里翁马耳他有限公司

地址 马耳他比尔基卡拉

(72) 发明人 大卫·伯格朗德

埃里克·伯格朗德

菲利克斯·塞尔伯格

克里斯蒂安·宾德

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 徐爱文 张奎燕

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

(54) 发明名称

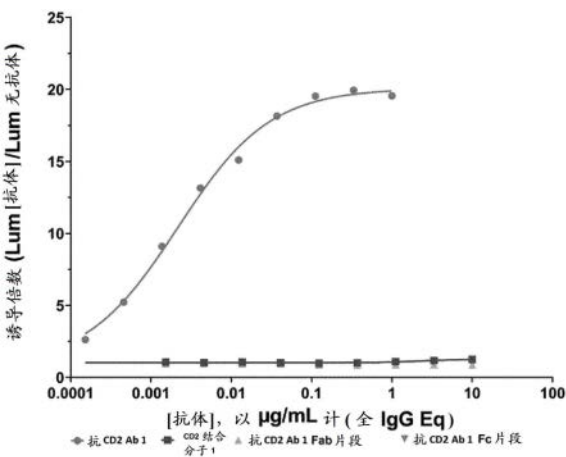
抗CD2抗体

(57) 摘要

本文提供了改进的抗CD2抗体及其在治疗和/或预防免疫系统的慢性或急性病症中的使用方法。本文还提供了通过施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂来治疗或预防受试者的免疫相关病症或疾病的方法。还公开了与这些方法一起使用的组合物和试剂盒。

权利要求书6页 说明书112页

序列表17页 附图30页

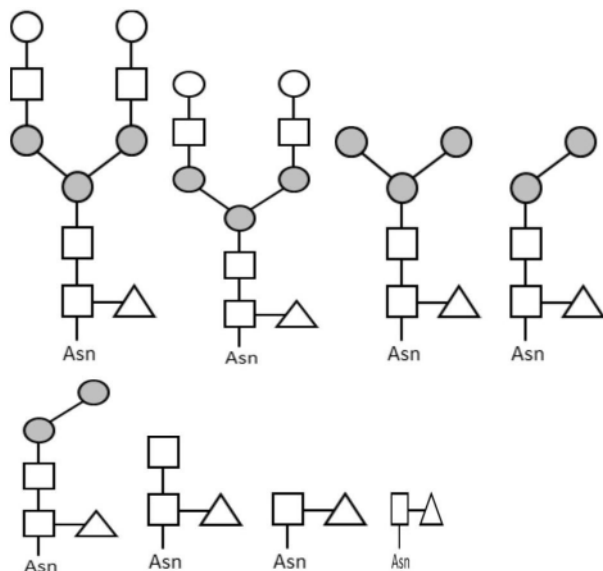


1. 一种重组抗CD2抗体,其中所述抗体是IgG抗体,其中所述抗体介导抗体依赖性细胞细胞毒性的能力降低或消除,而所述抗体的免疫调控活性相对于西利珠单抗得以维持。

2. 一种重组抗CD2抗体,其中所述抗体是IgG抗体并且重链的恒定区的至少一个共有N-糖基化位点未糖基化。

3. 如权利要求1所述的抗体,其中至少一个共有序列已经突变,使得它不再糖基化。

4. 一种重组抗CD2抗体,其中所述抗体是IgG抗体并且所述重链的恒定区的至少一个共有N-连接的糖基化位点携带下列寡糖之一:



其中符号如下:

空白三角形:岩藻糖;

空白正方形:N-乙酰葡萄糖胺;

灰色圆圈:甘露糖;以及

空白圆圈:半乳糖。

5. 一种重组抗CD2抗体,其中所述抗体是已经在哺乳动物细胞中表达的IgG抗体并且其中所述抗体已经用糖苷内切酶处理。

6. 如权利要求5所述的抗体,其中所述哺乳动物细胞是NS0鼠骨髓瘤细胞、PER.C6®人细胞或中国仓鼠卵巢(CH0)细胞。

7. 如权利要求5所述的抗体,其中所述糖苷内切酶是EndoS2。

8. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中人CD2的N18、K55和T59的氨基酸残基决定所述抗体对人CD2的亲和力。

9. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体介导抗体依赖性细胞细胞毒性的能力降低或消除,而所述抗体的免疫调控活性得以维持。

10. 如权利要求9所述的抗体,其中所述免疫调控活性可以包括对CD4+/CD25+T细胞的诱导。

11. 如权利要求9所述的抗体,其中所述免疫调控活性可以包括增加的FoxP3表达。

12. 如权利要求9所述的抗体,其中所述免疫调控活性可以包括对CD69+NK细胞的阻抑。

13. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体为IgG1。

14. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体为IgG2。
15. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体为IgG4。
16. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体是人源化的。
17. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体是全人源的。
18. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体相对于IgG包含附加抗体组分。
19. 如权利要求18所述的抗体,其中所述附加抗体组分可以是所述重组抗CD2抗体的重复区域。
20. 如权利要求18所述的抗体,其中附加抗体组分连接到所述重组抗CD2抗体的Fc区的C端。
21. 如权利要求18所述的抗体,其中所述附加抗体组分可以包含结合CD2、CH2结构域或CH3结构域的scFv。
22. 如权利要求21所述的抗体,其中所述scFv结构域包含VH和VL,其中所述VH的序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一,并且其中所述VL的序列与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一。
23. 如权利要求21所述的抗体,其中所述CH2结构域包含与SEQ ID NO:18或19的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的氨基酸序列。
24. 如权利要求21所述的抗体,其中所述CH3结构域包含与SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的氨基酸序列。
25. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中
 - a. 所述抗体的重链可变区CDR 1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;并且
 - b. 所述抗体的重链可变区CDR 2包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;并且
 - c. 所述抗体的重链可变区CDR 3包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;并且
 - d. 所述抗体的轻链可变区CDR 1包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且
 - e. 所述抗体的轻链可变区CDR 2包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;并且
 - f. 所述抗体的轻链可变区CDR 3包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。
26. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体Fc区具有一个或多个引起Fc沉默的点突变。
27. 如权利要求26所述的抗体,其中所述抗体是IgG1。
28. 如权利要求26所述的抗体,其中所述抗体是IgG2。
29. 如权利要求26所述的抗体,其中所述抗体是IgG4。
30. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体具有与西利珠单抗不同的天然恒定区。
31. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体具有与西利珠单抗不同的天然恒定区和所述Fc区中引起Fc沉默的点突变。
32. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的氨基酸序列。

33. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述重链恒定区包含SEQ ID NO:9、10、11、12或13的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9、10、11、12或13的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的氨基酸序列;并且其中所述轻链恒定区包含SEQ ID NO:14或15的氨基酸序列或与SEQ ID NO:14或15的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的氨基酸序列。

34. 如前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述重链包含SEQ ID NO:16的核酸序列或与SEQ ID NO:16至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的核酸序列;并且其中所述轻链包含SEQ ID NO:17的核酸序列或与SEQ ID NO:17至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的核酸序列。

35. 一种重组抗CD2抗体,其包含SEQ ID NO:1的重链可变区;SEQ ID NO:2的轻链可变区;SEQ ID NO:9、10、11、12或13的重链恒定区;和SEQ ID NO:14或15的轻链恒定区。

36. 一种核酸序列,其包含SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17。

37. 一种药物制剂,其包含如前述权利要求中任一项所述的抗体。

38. 如权利要求36所述的药物制剂,其中所述制剂适合于长期施用。

39. 一种治疗患者体内免疫系统的慢性病症的方法,其中所述方法包括向所述患者施用如权利要求1至38中任一项所述的抗体。

40. 如权利要求39所述的方法,其中治疗所述患者持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19年或至少20年的时间段。

41. 一种在移植接受者中维持对移植物的免疫耐受的方法,其中所述方法包括向所述移植接受者施用如权利要求1至38中任一项所述的抗体。

42. 如权利要求41所述的方法,其中向所述移植接受者施用所述抗体持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19年或至少20年的时间段。

43. 如权利要求39或40所述的方法,其中所述免疫系统的急性或慢性病症是移植物抗宿主病(GVHD)、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、1型糖尿病、银屑病、溃疡性结肠炎、炎性肠病(克罗恩氏病)、乳糜泻、舍格伦氏病、狼疮、多发性硬化、局灶性节段性肾小球硬化、特应性皮炎、肌萎缩性侧索硬化、原发性胆汁性肝硬化以及原发性硬化性胆管炎和严重哮喘。

44. 一种在有需要的受试者中治疗或预防免疫相关病症或疾病的方法,所述方法包括:

- a) 向所述受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段;并且
- b) 向所述受试者施用CTLA-4共刺激阻滞剂。

45. 如权利要求44所述的方法,其中所述抗CD2抗体或其抗原结合片段包括Fc沉默抗CD2抗体、BTI-322、CB.219、LO-CD2b、西利珠单抗和/或其抗原结合片段中的至少一种。

46. 如权利要求44所述的方法,其中所述抗CD2抗体或其抗原结合片段包含:

- a) SEQ ID NO:3的重链可变区CDR 1;
- b) SEQ ID NO:4的重链可变区CDR 2;
- c) SEQ ID NO:5的重链可变区CDR 3;
- d) SEQ ID NO:6的轻链可变区CDR 1;
- e) SEQ ID NO:7的轻链可变区CDR 2;和

f) SEQ ID NO:8的轻链可变区CDR 3。

47. 如权利要求44-47中任一项所述的方法,其中所述抗CD2抗体是人源化抗体。

48. 如权利要求44-47中任一项所述的方法,其中所述抗CD2抗体是西利珠单抗或其抗原结合片段。

49. 如权利要求44-49中任一项所述的方法,其中所述CTLA-4共刺激阻滞剂是包含人IgG1免疫球蛋白的Fc片段和CTLA4的胞外结构域的融合蛋白。

50. 如权利要求44-49中任一项所述的方法,其中所述CTLA-4共刺激阻滞剂包含与SEQ ID NO:22约或至少约80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%同一的序列。

51. 如权利要求44-51中任一项所述的方法,其中所述CTLA-4共刺激阻滞剂包含与SEQ ID NO:22同一的序列。

52. 如权利要求44-51中任一项所述的方法,其中所述CTLA-4共刺激阻滞剂是贝拉西普。

53. 如权利要求44-49中任一项所述的方法,其中所述CTLA-4共刺激阻滞剂包含与SEQ ID NO:23约或至少约80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%同一的序列。

54. 如权利要求44-49或54中任一项所述的方法,其中所述CTLA-4共刺激阻滞剂包含与SEQ ID NO:23同一的序列。

55. 如权利要求44-49或54-55中任一项所述的方法,其中所述CTLA-4共刺激阻滞剂是阿巴西普。

56. 如权利要求44-56中任一项所述的方法,其中所述免疫相关病症或疾病是全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、多关节幼年特发性关节炎(JIA)、骨关节炎、幼年慢性关节炎、脊柱关节病、系统性硬化症、特发性炎性肌病、舍格伦综合征、系统性血管炎、结节病、自身免疫性溶血性贫血、恶性贫血、自身免疫性血小板减少症、甲状腺炎、糖尿病、免疫介导的肾脏疾病、中枢或外周神经系统脱髓鞘疾病、特发性脱髓鞘性多发性神经病、格林-巴利综合征、莱姆病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、肝胆疾病、感染性或自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、古德帕斯丘综合征、肉芽肿性肝炎、硬化性胆管炎、炎症性肠病、谷蛋白敏感性肠病、惠普耳氏病、自身免疫性或免疫介导的皮肤病、大疱性皮肤病、多形性红斑、接触性皮炎、银屑病、过敏性疾病、哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎、食物过敏、荨麻疹、多发性硬化、葡萄膜炎、肺部免疫性疾病、嗜酸细胞性肺炎、特发性肺纤维化、过敏性肺炎、器官移植相关疾病、组织移植相关疾病、移植物排斥、移植物抗宿主病、德维克氏病、急性播散性脑脊髓炎、急性脱髓鞘性视神经炎、脱髓鞘性横贯性脊髓炎、米勒费雪综合征、脑脊髓神经根神经病、急性脱髓鞘性多神经病、肿胀性多发性硬化、巴洛氏同心性硬化、斑秃、强直性脊柱炎、美尼尔氏病、抗磷脂综合征、混合性结缔组织病、自身免疫性艾迪生病、重症肌无力、自身免疫性肝炎、寻常型天疱疮、白塞氏病、大疱性类天疱疮、结节性多动脉炎、心肌病、多软骨炎、口炎性腹泻-皮炎、多腺体综合征、慢性疲劳综合征(cfids)、风湿性多肌痛、慢性炎症性脱髓鞘、多发性肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、查格-施特劳斯综合征、瘢痕性类天疱疮、crest综合征、雷诺现象、冷凝集素病、赖特综合征、克罗恩病、风湿热、盘状狼疮、特发性混合性冷凝球蛋白血症、纤维肌痛、硬皮病、格雷夫氏病、舍格伦综合征、僵人综合征、桥本氏甲状腺炎、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、溃疡性结肠炎、IgA肾病、胰岛素依赖型糖尿病(I型)、扁平苔

藓、白癜风或其任何组合。

57. 如权利要求44-56中任一项所述的方法,其中所述免疫相关病症或疾病是类风湿性关节炎、多关节幼年特发性关节炎(JIA)、银屑病关节炎或其组合。

58. 如权利要求44-56中任一项所述的方法,其中所述免疫相关病症或疾病是器官移植相关疾病、组织移植相关疾病或其组合。

59. 如权利要求44-61中任一项所述的方法,其中当所述CTLA-4共刺激阻滞剂未施用于所述受试者时,一定剂量的所述抗CD2抗体或其抗原结合片段不是治疗有效的。

60. 如权利要求44-61中任一项所述的方法,其中当所述抗CD2抗体或其抗原结合片段未施用于所述受试者时,一定剂量的所述CTLA-4共刺激阻滞剂不是治疗有效的。

61. 如权利要求44-60中任一项所述的方法,其中在所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和所述CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于所述受试者之后从所述受试者获得的生物样品中的细胞数目与在所述抗CD2抗体或其抗原结合片段或所述CTLA-4共刺激阻滞剂,而非两者施用于所述受试者之后从所述受试者获得的生物样品中的细胞数目相比,低约或至少约10%。

62. 如权利要求44-60中任一项所述的方法,其中所述方法引起在所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和所述CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于所述受试者之后从所述受试者获得的生物样品中的细胞数目降低与向所述受试者施用所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或施用所述CTLA-4共刺激阻滞剂中的至少一种之前从所述受试者获得的生物样品中的细胞数目降低相比更多。

63. 如权利要求44-62中任一项所述的方法,其中所述方法引起在所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和所述CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于所述受试者之后从所述受试者获得的生物样品中的CD2水平降低与向所述受试者施用所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或施用所述CTLA-4共刺激阻滞剂中的至少一种之前从所述受试者获得的生物样品中的CD2水平降低相比更多。

64. 如权利要求44-62中任一项所述的方法,其中所述方法引起在所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和所述CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于所述受试者之后从所述受试者获得的生物样品中的CD2水平降低与在所述抗CD2抗体或其抗原结合片段或所述CTLA-4共刺激阻滞剂,而非两者施用于所述受试者之后从所述受试者获得的生物样品中的CD2水平降低相比更多。

65. 如权利要求66-67中任一项所述的方法,其中所述更多的降低是多约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、100%或超过100%。

66. 如权利要求62所述的方法,其中从所述受试者获得的所述生物样品中的所述细胞数目低约或至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、100%或超过100%。

67. 如权利要求44-56或58-66中任一项所述的方法,其中所述受试者接受器官移植和/或组织移植。

68. 如权利要求70所述的方法,其中所述抗CD2抗体或其抗原结合片段在所述器官移植和/或组织移植之后的两周内向所述受试者施用至少一次。

69. 如权利要求70或68所述的方法,其中所述抗CD2抗体或其抗原结合片段在所述器官移植和/或组织移植当天、在所述器官和/或组织移植之后的第1天和/或在所述器官和/或组织移植之后的第4天施用给所述受试者。

70. 如权利要求44-69中任一项所述的方法,其中所述抗CD2抗体或其抗原结合片段静脉内或皮下施用于所述受试者。

71. 如权利要求44-70中任一项所述的方法,其中所述方法还包括向所述受试者施用附加剂。

72. 如权利要求71所述的方法,其中所述附加剂包括类固醇、钙调磷酸酶抑制剂、环孢菌素、环磷酰胺、抗代谢疗法、非甾体抗炎药(NSAID)、用于治疗类风湿性关节炎的剂和/或mTOR抑制剂中的一种或多种。

73. 如权利要求71所述的方法,其中所述附加剂包括巴利昔单抗诱导、吗替麦考酚酯、皮质类固醇或其组合。

74. 如权利要求44-73中任一项所述的方法,其中第一剂的所述抗CD2抗体或其抗原结合片段在第一剂的所述CTLA-4共刺激阻滞剂之前施用。

75. 如权利要求44-73中任一项所述的方法,其中第一剂的所述抗CD2抗体或其抗原结合片段在第一剂的所述CTLA-4共刺激阻滞剂之后施用。

76. 如权利要求44-73中任一项所述的方法,其中第一剂的所述抗CD2抗体或其抗原结合片段与第一剂的所述CTLA-4共刺激阻滞剂同时施用。

77. 如权利要求44-76中任一项所述的方法,其中所述受试者是首次治疗的受试者。

78. 如权利要求44-76中任一项所述的方法,其中所述受试者对免疫相关病症或疾病的治疗具有抗性。

79. 如权利要求44-78中任一项所述的方法,其中与向所述受试者施用所述抗CD2抗体或施用所述CTLA-4共刺激阻滞剂而非两者相比,施用所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和所述CTLA-4共刺激阻滞剂具有协同作用。

80. 如权利要求44-79中任一项所述的方法,其中与向所述受试者施用所述抗CD2抗体或施用所述CTLA-4共刺激阻滞剂而非两者之后的同种免疫应答降低相比,施用所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和所述CTLA-4共刺激阻滞剂引起更多的同种免疫应答降低。

81. 如权利要求80所述的方法,其中所述更多的降低是多约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、100%或超过100%。

82. 如权利要求80或81所述的方法,其中使用体外T细胞增殖测定或混合淋巴细胞反应(MLR)测定来确定所述同种免疫应答。

抗CD2抗体

[0001] 相关申请案的交叉引用

[0002] 本申请要求保护2021年4月30日提交的美国临时申请第63/182,095号、2021年1月8日提交的美国临时申请第63/135,381号以及2020年6月23日提交的美国临时申请第63/042,844号的利益,每个美国临时申请的内容通过引用整体并入本文。

[0003] 电子提交的序列表的引用

[0004] 本申请通过引用并入随本申请一起作为文本文件提交的序列表,该文本文件标题为“Sequence_Listing_14526-005-228.TXT”,创建于2021年6月15日并且大小为33,862字节。

1. 技术领域

[0005] 本申请涉及经改进的抗CD2抗体及其在治疗和/或预防免疫系统的慢性或急性病症中的用途。还公开了这些抗体在免疫耐受的诱导和维持中的用途。本文还提供了通过施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂来治疗或预防受试者的免疫相关病症或疾病的方法。还公开了与这些方法一起使用的组合物和试剂盒。

2. 背景技术

[0006] 患有免疫系统病症(例如,免疫系统的慢性炎症性病症)的患者必须进行长期治疗以管理他们的病状。因此,潜在的治疗方案必须优先将导致器官损伤和其他不利影响的免疫抑制剂的使用减到最少,同时治疗疾病的症状并维持患者的生活质量。因此,迫切需要将标准免疫抑制疗法的不利副作用减到最少的疗法。此外,需要改进的方法和组合物来治疗免疫相关病症,诸如自身免疫性疾病和与器官移植相关的免疫病症,因为器官移植的长期结果仍然不能令人满意。供体移植物的慢性排斥以及与免疫抑制剂长期使用相关的健康问题仍然是手术的严重并发症。迫切需要可以在数月或数年的过程中向患者长期施用而没有标准免疫抑制疗法的不利副作用的疗法。还需要可以治疗免疫相关疾病的急性症状的方法和组合物,例如通过减轻病症的体征和症状,降低病症复发的可能性,预防器官或组织移植排斥,和/或预防在可能发展免疫病症的受试者中发生免疫病症。

[0007] 西利珠单抗(siplizumab)是一种针对人CD2糖蛋白的人源化IgG1 κ 单克隆抗体,CD2糖蛋白是一种在几乎所有成熟T细胞和绝大多数胸腺细胞上表达的受体(Bierer BE, Burakoff SJ., Immunol Rev.1989;111:267-294)。CD2通过它与配体LFA-3(CD58)的相互作用来促进T细胞附着于抗原呈递细胞(van der Merwe PA, Barclay AN, Mason DW等人, Biochemistry.1994;33(33):10149-10160)。CD2与LFA-3的结合也导致T细胞活化所必需的细胞内信号级联,赋予该分子重要的共刺激功能(Bockenstedt LK.等人, J Immunol.1988; 141(6):1904-1911)。

[0008] 西利珠单抗已用于造血细胞移植和肾-骨髓联合移植(CKBMT)的耐受性诱导的预处理方案。西利珠单抗全局耗竭T细胞,同时在移植后早期富集调控性T细胞(Treg)。在进行造血细胞移植以治疗恶性肿瘤的受者(Shaffer J.等人, Exp Hematol.2007;35(7):1140-

1152) 和CKBMT受者 (Andreola G. 等人, Am J Transplant. 2011; 11 (6) : 1236-1247) 中, 在T细胞重建阶段观察到调控性T细胞 (Treg) 的显著早期富集。

[0009] 随着单克隆抗体在各种类型疾病的治疗中变得不可或缺, 对这些治疗性抗体的工程改造变得更加复杂, 以便设计和产生针对特定目的优化的抗体 (Kellner 等人, Transfus Med Hemother. 2017年9月; 44 (5) : 327-336)。Fc的修饰是此类工程改造的实例。Fc介导的效应子功能, 诸如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC), 是一些治疗方案的重要组成部分, 同时也是其他治疗方案的障碍。使Fc信号传导沉默的修饰可有益于ADCC会对其产生进一步并发症的患者。对于需要长期免疫抑制的患者, 经工程改造以提供免疫调控活性但缺乏ADCC活性的抗体将是有益的。

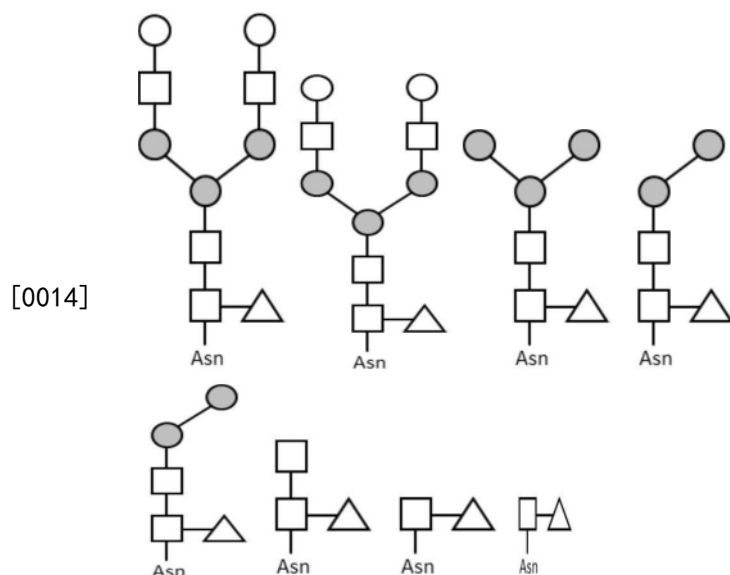
[0010] 本公开还描述了抗C2抗体或其抗原片段与CTLA-4共刺激阻滞剂的组合疗法, 用于治疗或预防受试者的免疫相关疾病或病症。CTLA4以两种主要方式抑制免疫应答—它与CD28竞争B7配体, 从而阻断共刺激, 它还进行负信号传导以抑制T细胞活化 (Krummel 和 Allison, 1995, J Exp Med 182: 459-465; Walunas 等人, 1994, Immunity 1: 405-413)。阿巴西普 (abatacept), 一种由免疫球蛋白IgG1的Fc区融合到CTLA-4的胞外结构域组成的融合蛋白, 与CD80和CD86分子结合, 并防止T细胞被活化。贝拉西普 (belatacept) 是一种由人IgG1免疫球蛋白的Fc片段连接到CTLA-4的胞外结构域组成的融合蛋白并且与阿巴西普有两个氨基酸不同。与阿巴西普类似, 贝拉西普对CD80抗原和CD86抗原具有特异性并充当外周T细胞功能的负调控剂。本公开提供了 (抗C2抗体或其抗原片段和CTLA-4共刺激阻滞剂的) 组合疗法与抗C2抗体或其抗原片段或CTLA-4共刺激阻滞剂中仅一种而非两者施用于受试者时相比, 显示出协同作用。

3. 发明内容

[0011] 无论说明书在哪里讨论“抗CD2抗体”, 相同的公开内容也可以适用于“CD2结合分子”, 反之亦然。本文提供了一种重组抗CD2抗体, 其中所述抗体是IgG抗体, 其中所述抗体介导抗体依赖性细胞毒性的能力降低或消除, 而所述抗体的免疫调控活性相对于西利珠单抗得以维持。本文还提供了一种重组抗CD2抗体, 其中所述抗体是IgG抗体并且重链的恒定区的至少一个共有N-糖基化位点未糖基化。在某些实施方案中, 所述抗体的至少一个共有序列已经突变, 使其不再糖基化。本文还提供了一种重组抗CD2抗体, 其中Fc区突变, 使得所述抗体缺乏与Fc受体和C1q结合的能力。

[0012] 本文公开的“抗CD2抗体”或“CD2结合分子”还可包含扩大的抗CD2变体, 其中附加组分被添加到Fc区。这些组分可以包括但不限于scFv、CH2结构域和CH3结构域。

[0013] 本文提供了一种重组抗CD2抗体, 其中所述抗体是IgG抗体并且所述重链的所述恒定区的至少一个共有N-连接的糖基化位点携带下列寡糖之一:



[0015] 其中符号如下：空白三角形：岩藻糖；空白正方形：N-乙酰葡萄糖胺；灰色圆圈：甘露糖；以及空白圆圈：半乳糖。

[0016] 本文还提供了一种重组抗CD2抗体，其中所述抗体是已经在哺乳动物细胞中表达的IgG抗体并且其中所述抗体已经用糖苷内切酶处理。在某些实施方案中，所述哺乳动物细胞是NS0鼠骨髓瘤细胞、PER.C6®人细胞或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在某些实施方案中，所述糖苷内切酶是EndoS2。在某些实施方案中，人CD2的N18、K55和T59的氨基酸残基决定所述抗体对人CD2的亲和力。

[0017] 在某些实施方案中，所述抗体介导抗体依赖性细胞毒性的能力降低或消除，而所述抗体的免疫调控活性得以维持。在另一个实施方案中，所述免疫调控活性可以包括对CD4+/CD25+T细胞的诱导。在另一个实施方案中，所述免疫调控活性可以包括增加FoxP3表达。在另一个实施方案中，所述免疫调控活性可以包括对CD69+NK细胞的阻抑。在某些实施方案中，所述抗体是IgG1、IgG2或IgG4。在另一个实施方案中，所述抗体是人源化的。在又一个实施方案中，所述抗体是全人源的。

[0018] 在某些实施方案中，所述抗体可包含SEQ ID NO:3的重链可变区CDR 1、SEQ ID NO:4的重链可变区CDR 2、SEQ ID NO:5的重链可变区CDR 3、SEQ ID NO:6的轻链可变区CDR 1、SEQ ID NO:7的轻链可变区CDR 2和ID NO:8的轻链可变区CDR 3。在另一个实施方案中，抗体Fc区具有导致Fc沉默的点突变。在另一个实施方案中，所述抗体是IgG1。在另一个实施方案中，所述抗体是IgG2。在另一个实施方案中，所述抗体是IgG4。在又一个实施方案中，所述抗体具有与西利珠单抗不同的天然恒定区。在又一个实施方案中，所述抗体具有与西利珠单抗不同的天然恒定区和所述Fc区中引起Fc沉默的点突变。

[0019] 在某个实施方案中，所述抗体的重链可变区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的氨基酸序列；并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的氨基酸序列。

[0020] 在某些实施方案中，本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的重链恒定区的序列与SEQ ID NO:09、10、11、12或13有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。在某些实施方案中，本文所述的CD2结合分

子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的轻链恒定区的序列与SEQ ID NO:14或15有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。

[0021] 在再另一个实施方案中,所述抗体的重链包含SEQ ID NO:16的DNA序列或与SEQ ID NO:16的DNA序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的DNA序列;并且其中所述轻链包含SEQ ID NO:17的DNA序列或与SEQ ID NO:17的DNA序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的DNA序列。

[0022] 本文提供了一种药物制剂,其包含如前述权利要求中任一项所述的抗体。在某个实施方案中,所述药物制剂适合于长期施用。本文还提供了治疗患者免疫系统的慢性病症的方法,其中所述方法包括向患者施用本文所述的抗体。在某些实施方案中,所述患者治疗持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19年或至少20年的时间段。

[0023] 本文提供了在移植接受者中维持对移植物的免疫耐受的方法,其中所述方法包括向移植接受者施用本文所述的抗体。在某些实施方案中,向所述移植接受者施用所述抗体持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19年或至少20年的时间段。在其他实施方案中,免疫系统的急性或慢性病症可包括但不限于移植物抗宿主病(GVHD)、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、1型糖尿病、银屑病、溃疡性结肠炎、炎症性肠病(克罗恩氏病)、乳糜泻、舍格伦氏病、狼疮、多发性硬化、局灶性节段性肾小球硬化、特应性皮炎、肌萎缩性侧索硬化、原发性胆汁性肝硬化以及原发性硬化性胆管炎和严重哮喘。

[0024] 本文还提供了治疗或预防受试者的免疫相关病症或疾病的方法,该方法是通过(a)向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段;并且(b)向受试者施用CTLA-4共刺激阻滞剂。在一些实施方案中,所述抗CD2抗体或其抗原结合片段在向受试者施用CTLA-4共刺激阻滞剂之前、同时或之后施用。在一些实施方案中,所述受试者对免疫相关病症或疾病的治疗具有抗性。在一些实施方案中,所述受试者是首次治疗的受试者。在一些实施方案中,当所述CTLA-4共刺激阻滞剂未施用于所述受试者时,一定剂量的所述抗CD2抗体或其抗原结合片段不是治疗有效的。在一些实施方案中,当所述抗CD2抗体或其抗原结合片段未施用于所述受试者时,一定剂量的所述CTLA-4共刺激阻滞剂不是治疗有效的。

[0025] 在一些实施方案中,向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂与向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段或CTLA-4共刺激阻滞剂中的一种而非两者相比具有协同作用。在一些实施方案中,在所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和所述CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于所述受试者之后从所述受试者获得的生物样品中的细胞数目与在所述抗CD2抗体或其抗原结合片段或所述CTLA-4共刺激阻滞剂,而非两者施用于所述受试者之后从所述受试者获得的生物样品中的细胞数目相比,低约或至少约10%。

[0026] 在一些实施方案中,本文提供的方法引起在所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和所述CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于所述受试者之后从所述受试者获得的生物样品中的细胞数目降低与向所述受试者施用所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或所述CTLA-4共刺激阻滞剂中的至少一种之前从所述受试者获得的生物样品中的细胞数目降低相比更多。在一些实施方案中,从所述受试者获得的所述生物样品中的所述细胞数目低约或至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、

85%、90%、100%或超过100%。

[0027] 在一些实施方案中,本文提供的方法引起在所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和所述CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于所述受试者之后从所述受试者获得的生物样品中的CD2水平降低与向所述受试者施用所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或所述CTLA-4共刺激阻滞剂中的至少一种之前从所述受试者获得的生物样品中的CD2水平降低相比更多。在一些实施方案中,本文提供的方法引起在所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和所述CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于所述受试者之后从所述受试者获得的生物样品中的CD2水平降低与在所述抗CD2抗体或其抗原结合片段或所述CTLA-4共刺激阻滞剂,而非两者施用于所述受试者之后从所述受试者获得的生物样品中的CD2水平降低相比更多。在一些实施方案中,所述降低多约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、100%或超过100%。

[0028] 在一些实施方案中,与向所述受试者施用所述抗CD2抗体或所述CTLA-4共刺激阻滞剂中的一者而非两者之后的同种免疫应答降低相比,施用所述抗CD2抗体或其抗原结合片段和所述CTLA-4共刺激阻滞剂引起更多的同种免疫应答降低。在一些实施方案中,所述更多的降低是多约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、100%或超过100%。在一些实施方案中,使用体外T细胞增殖测定或混合淋巴细胞反应(MLR)测定来确定所述同种免疫应答。

[0029] 在一些实施方案中,所述抗CD2抗体或其抗原结合片段包括Fc沉默抗CD2抗体、BTI-322、CB.219、LO-CD2b、西利珠单抗和/或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗CD2抗体或其抗原结合片段包含(a)SEQ ID NO:3的重链可变区CDR 1;(b)SEQ ID NO:4的重链可变区CDR 2;(c)SEQ ID NO:5的重链可变区CDR 3;(d)SEQ ID NO:6的轻链可变区CDR 1;(e)SEQ ID NO:7的轻链可变区CDR 2;和(d)SEQ ID NO:8的轻链可变区CDR 3。在一些实施方案中,所述抗体是人源化抗体。在一些实施方案中,所述抗体是西利珠单抗。

[0030] 在一些实施方案中,所述CTLA-4共刺激阻滞剂是包含人IgG1免疫球蛋白的Fc片段和CTLA-4的胞外结构域的融合蛋白。在一些实施方案中,所述CTLA-4共刺激阻滞剂包含与SEQ ID NO:22约或至少约80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%同一的序列。在一些实施方案中,所述CTLA-4共刺激阻滞剂包含与SEQ ID NO:22相同的序列。在一些实施方案中,所述CTLA-4共刺激阻滞剂包含与SEQ ID NO:23约或至少约80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%同一的序列。在一些实施方案中,所述CTLA-4共刺激阻滞剂包含与SEQ ID NO:23同一的序列。在一些实施方案中,所述CTLA-4共刺激阻滞剂是阿巴西普。在一些实施方案中,所述CTLA-4共刺激阻滞剂是贝拉西普。

[0031] 在一些实施方案中,所述免疫相关病症或疾病是全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、多关节幼年特发性关节炎(JIA)、骨关节炎、幼年慢性关节炎、脊柱关节病、系统性硬化症、特发性炎性肌病、舍格伦综合征(Sjögren's syndrome)、系统性血管炎、结节病、自身免疫性溶血性贫血、恶性贫血、自身免疫性血小板减少症、甲状腺炎、糖尿病、免疫介导的肾脏疾病、中枢或外周神经系统脱髓鞘疾病、特发性脱髓鞘性多发性神经病、格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome)、莱姆病(lyme disease)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、肝胆疾病、感染性或自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、古德帕斯丘综合征(Goodpasture syndrome)、肉芽肿性肝炎、硬化性胆管炎、炎症性肠病、谷

蛋白敏感性肠病、惠普耳氏病(Whipple's disease)、自身免疫性或免疫介导的皮肤病、大疱性皮肤病、多形性红斑、接触性皮炎、银屑病、过敏性疾病、哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎、食物过敏、荨麻疹、多发性硬化、葡萄膜炎、肺部免疫性疾病、嗜酸细胞性肺炎、特发性肺纤维化、过敏性肺炎、器官移植相关疾病、组织移植相关疾病、移植物排斥、移植物抗宿主病、德维克氏病、急性播散性脑脊髓炎、急性脱髓鞘性视神经炎、脱髓鞘性横向脊髓炎、米勒费雪综合征(Miller-Fisher syndrome)、脑脊髓神经根神经病、急性脱髓鞘性多神经病、肿胀性多发性硬化、巴洛氏同心性硬化、斑秃、强直性脊柱炎、美尼尔氏病(meniere's disease)、抗磷脂综合征、混合性结缔组织病、自身免疫性艾迪生病、重症肌无力、自身免疫性肝炎、寻常型天疱疮、白塞氏病(behcet's disease)、大疱性类天疱疮、结节性多动脉炎、心肌病、多软骨炎、口炎性腹泻-皮炎、多腺体综合征、慢性疲劳综合征(cfids)、风湿性多肌痛、慢性炎症性脱髓鞘、多发性肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、查格-施特劳斯综合征(churg-strauss syndrome)、瘢痕性类天疱疮、crest综合征、雷诺现象、冷凝集素病、赖特综合征(reiter's syndrome)、克罗恩病(crohn's disease)、风湿热、盘状狼疮、特发性混合性冷凝球蛋白血症、纤维肌痛、硬皮病、格雷夫氏病(grave's disease)、舍格伦综合征、僵人综合征、桥本氏甲状腺炎、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、溃疡性结肠炎、IgA肾病、胰岛素依赖型糖尿病(I型)、扁平苔藓、白癜风或其任何组合。在一些实施方案中,所述免疫相关病症或疾病是类风湿性关节炎、多关节幼年特发性关节炎(JIA)、银屑病关节炎或其组合。

[0032] 在一些实施方案中,所述免疫相关病症或疾病是器官移植相关疾病、组织移植相关疾病或其组合。在一些实施方案中,所述抗CD2抗体或其抗原结合片段在所述器官移植和/或组织移植之后的两周内向所述受试者施用至少一次。在一些实施方案中,所述抗CD2抗体或其抗原结合片段在所述器官移植和/或组织移植当天,在所述器官移植和/或组织移植之后的第1天和/或在所述器官移植和/或组织移植之后的第4天施用于所述受试者。所述抗CD2抗体或其抗原结合片段经静脉或皮下施用于所述受试者。

[0033] 在一些实施方案中,本文提供的治疗方法还包括向所述受试者施用附加剂。在一些实施方案中,所述附加剂是免疫抑制剂。在一些实施方案中,所述附加剂包括类固醇、钙调磷酸酶抑制剂、环孢菌素、环磷酰胺、抗代谢疗法、NSAID、用于治疗类风湿性关节炎的药剂和/或mTOR抑制剂中的一种或多种。在一些实施方案中,所述附加剂包括巴利昔单抗诱导、吗替麦考酚酯、皮质类固醇或其组合。

4. 附图说明

[0034] 前述和其他的目的、特征和优点从本发明的特定实施方案的下列描述中将明显,如在附图中所示的。附图不一定按比例绘制,而是重点放在说明本发明的各个实施方案的原理上。

[0035] 图1示出了与抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗(MEDI-507))的Fc γ RIIIA信号传导相比,CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)诱导的Fc γ 受体(Fc γ R)IIIA信号传导缺乏。在体内,表达Fc γ RIIIA的细胞是抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的主要介质。在没有Fc γ RIIIA结合和信号传导的情况下,CD2结合分子1所结合的表达CD2的细胞将不会经由ADCC被耗竭。

[0036] 图2A-2B示出了CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)和抗CD2Ab1(例如,西利珠单抗)抑制CD4+/CD25+T细胞的活化(图2A)和增殖(图2B)的同等能力。

[0037] 图3示出了CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)和抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)诱导在免疫系统调控中重要的细胞的同等能力。通过与CD2结合分子1或抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)相互作用后递增的T调控(Treg)细胞百分比来测量调控免疫应答的能力。

[0038] 图4A-4B示出了在自体(图4A)或同种异体(图4B)混合淋巴细胞反应(MLR)中与抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)相比,CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)抑制NK细胞活化(诱导NK细胞上的CD69表达)的能力。

[0039] 图5示出了与抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗(MEDI-507))的Fc γ RIIA信号传导相比,CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)诱导的Fc γ 受体(Fc γ R)IIA信号传导的缺乏。在体内,表达Fc γ RIIA的细胞是抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的主要介质。在没有Fc γ RIIA结合和信号传导的情况下,CD2结合分子1所结合的表达CD2的细胞将不太可能经由ADCP被耗竭。

[0040] 图6示出了抗体和片段的免疫调控活性,如通过它们抑制CD69+T细胞活化的能力所测量的。与对照相比,抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)Fab片段不抑制CD69+T细胞的活化,而抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)和CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)两者均抑制活化。CD2结合分子1的免疫调控活性得以维持,而ADCC活性被消除。

[0041] 图7示出通过将scFv、CH2-区或CH3-区添加到西利珠单抗(IgG1)的经基因工程改造的IgG2或IgG4型式的Fc部分来构建扩大的抗CD2变体。

[0042] 图8A-8C是扩大的抗CD2变体的图示。图8A说明了分子5A(IgG2)和分子5B(IgG4)。图8B说明了分子6A(IgG2)和分子6B(IgG4)。图8C说明了分子7A(IgG2)和分子7B(IgG4)。

[0043] 图9A-9C示出分别稳定表达Fc γ 受体(Fc γ R)I(图9A)、Fc γ RIIA(图9B)或Fc γ RIIIA(图9C)的Jurkat报告细胞(Promega)与递增浓度的抗CD2抗体一起孵育。数据归一化为由最高浓度的抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)诱导的发光(平均值 $\pm$ SD;n=3)。报告细胞将靶标结合的IgG抗体的Fc片段与其Fc γ R结合,诱导荧光素酶报告基因的表达,从而在添加测定底物(Promega)时产生发光信号。将细胞分别与递增剂量的抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)、CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)、CD2结合分子2(Fc沉默(FcS)抗CD2 IgG1)、CD2结合分子3(FcS抗CD2 IgG2)和CD2结合分子4(FcS抗CD2 IgG4)一起孵育。

[0044] 图10A-10B示出不同淋巴细胞(亚)群上的CD2表达。数据显示为平均中值荧光强度 $\pm$ SEM(n=5;*p<0.05,**p<0.01)。图10A示出不同T细胞和NK细胞亚群上的CD2表达。CD56^{bright} NK细胞以与T细胞同等的水平表达CD2。相反,CD56^{dim}和CD56^{neg} NK细胞表达显著较低水平的CD2(重复测量单因素方差分析(repeated-measure one-way ANOVA),接着进行Dunnett多重比较检验,分别p=0.0074和p=0.0111)。图10B示出静止和活化的淋巴细胞群上的CD2表达。在T细胞(p=0.0034)、CD56^{dim} NK细胞(p=0.0024)、CD56^{bright} NK细胞(p=0.017)和CD56^{neg} CD16+ NK细胞(0.0029)上活化后CD2表达显著上调。在B细胞上没有观察到差异(双尾配对t检验)。

[0045] 图11A-11B示出Fc γ 受体(Fc γ R)II(CD32)和Fc γ RIII(CD16)在NK细胞上的表达。平均91.0%的NK细胞表达Fc γ RIII,而19.2%表达Fc γ RII(n=9)。平均值如水平线所示

(图11A)。Fc γ RII和Fc γ RIII在NK细胞(CD3-CD56+和/或CD16+淋巴细胞)上的表达的代表性图。上图示出了来自具有相对低CD32表达的供体的NK细胞的代表性图,下图示出了来自具有相对高CD32表达的供体的NK细胞的代表性图。(图11B)。

[0046] 图12A-12B示出随着时间的推移,混合淋巴细胞反应(MLR)和自体淋巴细胞培养(ALC)中NK细胞上的CD69表达。在基线(第0天)时和在1、2、4和7天后经由流式细胞术评估在没有添加抗体时(无抗体)和添加抗体时的CD69表达。经由双因素方差分析(two-way ANOVA)进行显著性检验,未处理的对照(无抗体)用作比较数据集(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)。抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)和CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)以10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 使用,先前已确定该剂量在7天内使靶抗原饱和。数据显示为平均值 $\pm$ SD($n = 12$)。图12A示出了MLR中随着时间的推移CD69+NK细胞的百分比。图12B示出了ALC中随着时间的推移CD69+NK细胞的百分比。

[0047] 图13A-13C示出了在7天混合淋巴细胞反应(MLR)后NK细胞上的CD69和CD2表达。经由单因素方差分析(one-way ANOVA)进行显著性检验,未处理的对照(无抗体)用作比较数据集(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)。抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)、CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)、CD2结合分子2(Fc沉默(FcS)抗CD2 IgG1)、CD2结合分子3(FcS抗CD2 IgG2)和CD2结合分子4(FcS抗CD2 IgG4)以0.0001-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 使用。数据显示为CD69+NK细胞的平均百分比 $\pm$ SD(图13A)或平均中值CD2荧光强度+SD(CD2 MFI; $n = 9$) (图13B)。未经处理的对照(无抗体)或10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗CD2中的NK细胞上CD2和CD69表达的代表性点图(图13C)。

[0048] 图14A-14D示出了NK细胞自相残杀。纯化的NK细胞在无抗体的情况下孵育,与0.001-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)或0.001-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CD2结合分子2、3或4(FcS抗CD2 IgG抗体)一起孵育过夜。经由单因素方差分析(one-way ANOVA)进行显著性检验,未处理的对照(无抗体)用作比较数据集($N = 6$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)。图14A示出了NK细胞裂解;7-AAD+NK细胞的平均百分比+SD。图14B示出了NK细胞计数;平均归一化NK细胞计数+SD。图14C示出了CD56^{dim} NK细胞计数;平均归一化CD56^{dim} NK细胞计数+SD。图14D示出了CD56^{bright} NK细胞计数;平均归一化CD56^{bright} NK细胞计数+SD。

[0049] 图15A-15C示出了纯化的NK细胞培养物中的NK细胞脱粒和ADCC。纯化的NK细胞在无抗体的情况下孵育,与0.001-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)或0.001-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的CD2结合分子2、3或4(FcS抗CD2 IgG抗体)一起孵育。经由单因素方差分析(one-way ANOVA)进行显著性检验,未处理的对照(无抗体)用作比较数据集($N = 6$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。图15A示出了NK细胞脱粒;CD107a+NK细胞的平均百分比+SD。图15B示出了NK细胞上的CD16表达;NK细胞上的平均中值CD16荧光强度+SD。图15A示出了代表性的热图点图,说明在纯化的NK细胞培养物中随着抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)剂量的增加CD16下调和NK细胞脱粒。

[0050] 图16A-16C示出了天然NK细胞的细胞毒性。纯化的NK细胞在无抗体的情况下预孵育,与0.001-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)或0.001-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的CD2结合分子2、3或4(Fc沉默(FcS)抗CD2 IgG抗体)一起预孵育30分钟(图16A)或两天(图16B),接着添加HLA I类靶细胞(SPI-801)。经由单因素方差分析(one-way ANOVA)进行显著性检验,未处理的对照(无抗体)用作比较数据集($N = 6$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。图16C示出了在没有

添加抗体(NK+SPI-801)时,在添加抗体和HLA I类靶细胞(NK)时或在抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)/CD2结合分子2(FcS抗CD2 IgG1)的存在下,响应于HLA I类靶细胞的NK细胞脱粒的代表性直方图。

[0051] 图17A-17D示出了抗体依赖性细胞毒性。纯化的NK细胞在没有添加抗体时预孵育或与饱和剂量的抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)/CD2结合分子2、3或4(FcS抗CD2抗体)一起预孵育,之后添加滴定剂量的抗CD2 Ab1(例如,西利珠单抗)和CD20+靶细胞(Daudi)。经由单因素方差分析(one-way ANOVA)进行显著性检验,未处理的对照(无抗体)用作比较数据集($N=6$; $(*)p<0.1$, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$)。图17A示出了NK细胞脱粒;CD107a+NK细胞的平均百分比+SD。图17B示出了靶细胞计数;平均归一化靶细胞计数+SD。图17C示出了CD2表达;NK细胞上的平均中值CD2荧光强度+SD。图17D示出代表性散点图,说明NK细胞上CD2表达增加,导致ADCC诱导。

[0052] 图18A-18H示出了在细胞与对照、抗CD2抗体1、贝拉西普、阿巴西普、抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合一起孵育7天或10天后的平均T细胞(CD4和CD8)增殖。图18A-18H中的图表示出了在混合淋巴细胞反应(MLR)中增殖的T细胞的平均百分比+标准偏差(SD) ($n=6$)。图18A和图18E示出了7天混合淋巴细胞反应(MLR)后的平均CD4 T细胞增殖;图18B和图18F示出了7天MLR后的平均CD8 T细胞增殖;图18C和图18G示出了10天MLR后的平均CD4 T细胞增殖;并且图18D和图18H示出了10天MLR后的平均CD8 T细胞增殖。MLR补充了递增浓度的阿巴西普(1×10^{-7} 至 $100 \mu\text{g/mL}$)、贝拉西普(1×10^{-7} 至 $100 \mu\text{g/mL}$)和抗CD2抗体1(5.08×10^{-5} 至 $1 \mu\text{g/mL}$)。抗CD2抗体1滴定系列(5.08×10^{-5} 至 $1 \mu\text{g/mL}$)补充了 $100 \mu\text{g/mL}$ 阿巴西普或 $100 \mu\text{g/mL}$ 贝拉西普。经由单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计分析,接着以未处理的对照(无抗体)作为比较数据集进行Dunnett多重比较检验($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$)。与单独用贝拉西普或阿巴西普处理相比,用抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合处理产生更低的活细胞百分比。

[0053] 图19A-19H示出了在细胞与对照、抗CD2抗体1、贝拉西普、阿巴西普、抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合一起孵育7天或10天后的平均T细胞(CD4和CD8)增殖。图19A-19D中的图表示出了在MLR中增殖的T细胞的平均百分比+SD($n=9$)。图19A和图19E示出了在7天混合淋巴细胞反应(MLR)后的平均CD4 T细胞增殖;图19B和图19F示出了在7天MLR后的平均CD8 T细胞增殖;图19C和图19G示出了在10天MLR后的平均CD4 T细胞增殖;并且图19D和图19H示出了在10天MLR后的平均CD8 T细胞增殖。MLR补充了递增浓度的阿巴西普(1×10^{-7} 至 $100 \mu\text{g/mL}$)、贝拉西普(1×10^{-7} 至 $100 \mu\text{g/mL}$)和抗CD2抗体1(5.08×10^{-5} 至 $1 \mu\text{g/mL}$)。阿巴西普或贝拉西普的滴定系列(1×10^{-7} 至 $100 \mu\text{g/mL}$)在整个滴定系列中补充了 $1 \mu\text{g/mL}$ 抗CD2抗体1。经由单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计分析,接着以未处理的对照(无抗体)作为比较数据集进行Dunnett多重比较检验($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$)。

[0054] 图20示出了代表性直方图,显示了在不同处理组中在10天MLR之后对CD4T细胞增殖的抑制。

[0055] 图21示出了表示调控性T细胞(Treg)富集的图表。MLR补充了递增浓度的阿巴西普(1×10^{-7} 至 $100 \mu\text{g/mL}$)、贝拉西普(1×10^{-7} 至 $100 \mu\text{g/mL}$)和抗CD2抗体1(5.08×10^{-5} 至 $1 \mu\text{g/mL}$)。

mL)。阿巴西普或贝拉西普的滴定系列(1×10^{-7} 至 $100 \mu\text{g/mL}$)在整个滴定系列中补充了 $1 \mu\text{g/mL}$ 抗CD2抗体1。经由单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计分析,接着以未处理的对照(无抗体)作为比较数据集进行Dunnett多重比较检验(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

[0056] 图22A-22B示出了在细胞与对照、抗CD2抗体1、贝拉西普、阿巴西普、抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合一起孵育7天或10天后的平均CD2水平。与单独用贝拉西普或阿巴西普处理相比,用抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合处理产生更低的CD2水平。

[0057] 图23A-23D示出了在细胞与对照、抗CD2抗体1、贝拉西普、阿巴西普、抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合一起孵育7天或10天后的T细胞数目。与单独用贝拉西普或阿巴西普处理相比,用抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合处理产生更低的细胞数目。

[0058] 图24A-24D示出了在细胞与对照、抗CD2抗体1、贝拉西普、阿巴西普、抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合一起孵育后的平均CD2或CD28水平。与单独用贝拉西普或阿巴西普处理相比,用抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合处理产生更低的CD2和CD28水平。

[0059] 图25A-25F示出了在细胞与对照、抗CD2抗体1、贝拉西普、阿巴西普、抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合一起孵育后使用低紫色增殖染料450 (VPD450) T细胞得到的流式细胞术图表。

[0060] 图26A-26G示出了在细胞与对照、抗CD2抗体1、贝拉西普、阿巴西普、抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合一起孵育后使用高紫色增殖染料450 (VPD450) T细胞得到的流式细胞术图表。

[0061] 图27A-27D示出了在细胞与对照、Fc沉默抗CD2 (IgG4)、贝拉西普、阿巴西普、Fc沉默抗CD2抗体1 (IgG4) 和贝拉西普的组合或Fc沉默抗CD2抗体1 (IgG4) 和阿巴西普的组合一起孵育7天或10天后的平均T细胞 (CD4和CD8) 增殖。与单独用贝拉西普或阿巴西普处理相比,用Fc沉默抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或Fc沉默抗CD2抗体1和阿巴西普的组合处理产生更低的细胞百分比。

[0062] 图28示出了基于细胞的Fc γ R结合测定。不同浓度的抗体,诸如抗CD2抗体(或西利珠单抗)、Fc沉默抗CD2 Ab-1、Fc沉默抗CD2 Ab-2、Fc沉默抗CD2 Ab-3、Fc沉默抗CD2 Ab-4、Fc沉默抗CD2 Ab-5、Fc沉默抗CD2 Ab-6或Fc沉默抗CD2 Ab-7)进行了Fc γ RI、Fc γ RIIA和Fc γ RIIEA结合测定。

[0063] 图29A-29B示出了在细胞与对照、Fc沉默抗CD2 Ab-5、贝拉西普或Fc沉默抗CD2 Ab-5和贝拉西普的组合一起孵育7天(图29A)或10天(图29B)后($n=6$;三个独立的MLR)的平均T细胞 (CD4和CD8) 增殖。

[0064] 图30A-30B示出了在细胞与对照、Fc沉默抗CD2 Ab-7、贝拉西普或Fc沉默抗CD2 Ab-7和贝拉西普的组合一起孵育7天(图30A)或10天(图30B)后的平均T细胞 (CD4和CD8) 增殖。

[0065] 图31A-31B示出了在细胞与对照、Fc沉默抗CD2 Ab-5、贝拉西普或Fc沉默抗CD2 Ab-5和贝拉西普的组合一起孵育($n=6$;三个独立的MLR)(图31A);或与对照、Fc沉默抗CD2 Ab-7、贝拉西普或Fc沉默抗CD2 Ab-7和贝拉西普的组合一起孵育($n=6$;三个独立的MLR)

(图31B)后的平均T细胞活化(CD69+和HLA-DR+)。

[0066] 图32A-32B示出了在细胞与对照、Fc沉默抗CD2 Ab7、贝拉西普、阿巴西普、Fc沉默抗CD2 Ab7和贝拉西普的组合或Fc沉默抗CD2 Ab7和阿巴西普的组合一起孵育7天(图32A)或10天(图32B)后的平均T细胞(CD4和CD8)增殖。与单独用贝拉西普、单独用阿巴西普或单独用Fc沉默抗CD2 Ab7处理相比,用Fc沉默抗CD2 Ab7和贝拉西普的组合或Fc沉默抗CD2 Ab7和阿巴西普的组合处理产生更低的细胞百分比(n=6;两个独立的MLR)。

5. 具体实施方式

[0067] 本文描述了CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段),其中该分子介导抗体依赖性细胞毒性的能力降低或消除,而该分子的免疫调控活性得以维持。本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可长期施用于要治疗免疫系统的慢性疾病的患者或施用于移植患者。

[0068] CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)在5.1节中有描述。具体地,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的结合特异性在5.1.1节中有描述;CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的非耗竭活性在5.1.2节中有描述;CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的免疫调控活性在5.1.3节中有描述;并且CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的功能修饰在5.1.4节中有描述。用于生成CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的方法在5.2节中有描述。所述CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的治疗用途和方法在5.3节中有描述。所述CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的药物组合物在5.4节中有描述。试剂盒在5.5节中有描述。评估本文所述的方法的临床结果的方法在5.6节中有描述。本文提供的方法的实例在6节中有描述。

[0069] 5.1CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)

[0070] 本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与CD2结合,如5.1.1节所详述。如本文所述,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以是抗体。如本文所述,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以是抗原结合片段。如本文所定义,抗体是指免疫球蛋白,包括IgG、IgM、IgE、IgA和IgD。本文所述的抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。在一些实施方案中,抗体可以是嵌合抗体。在一些实施方案中,抗体可以是人源化抗体。在一个具体实施方案中,抗体是重组抗体。在一个具体实施方案中,抗体是全人源抗体。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是IgG。在某个实施方案中,IgG可以是IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄。在具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是IgG₁、IgG₂或IgG₄。如本文所述,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以是抗原结合片段。在某些实施方案中,抗原结合片段是或者可以包含Fab、F(ab')₂、scFv(VH融合至VL)或sdAb。

[0071] 在一些实施方案中,术语“抗CD2抗体或其抗原结合片段”可与术语“CD2结合分子”互换使用。在一些实施方案中,与本发明的方法和组合物一起使用的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)具有大鼠抗CD2单克隆抗体BTI-322的CDR序列。在一些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以是BTI-322(西利珠单抗;MEDI-507)的人源化IgG1型式。在一些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是Fc沉默抗CD2抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其

抗原结合片段)是BTI-322或其抗原结合片段。在一些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是CB.219或其抗原结合片段。在一些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是L0-CD2b或其抗原结合片段。在一些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是西利珠单抗或其抗原结合片段。在一些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是抗CD2抗体1或其抗原结合片段。在一些实施方案中,本公开的抗CD2抗体1是西利珠单抗或其抗原结合片段。在一些实施方案中,本文所述的方法包括施用至少一种、至少两种、至少三种或多于至少三种CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。在一些实施方案中,本文所述的方法包括施用一种或多于一种CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。在某些实施方案中,本文所述的方法包括将CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与CTLA-4共刺激阻滞剂组合施用于受试者。

[0072] 如本文所述的抗体可以由通过二硫键连接的两条重链和两条轻链组成。每条重链可包含可变区(VH)和恒定区。每条轻链可包含可变区(VL)和恒定区。重链和轻链的可变区决定了抗体与抗原的结合。互补决定区(CDR)是重链和轻链可变区上的可变环。每条重链上有三个CDR并且每条轻链上有三个CDR。在某些实施方案中,如本文所述的抗体与CD2结合。参见5.1.1节。

[0073] 在某些实施方案中,施用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)不会引起靶细胞耗竭;参见5.1.2节。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出免疫调控活性;参见5.1.3节。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)制止靶细胞耗竭同时保留免疫调控活性的能力是通过消除Fc区的糖基化实现的;参见5.1.4节。

[0074] 5.1.1CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的结合特异性

[0075] 如本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与CD2(也称为T11、SRBC(绵羊红细胞受体)和LFA-2)特异性结合。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与人CD2(GenBank登录号NM_001328609.1(同种型1);NM_001767.5(同种型2))结合。在某些实施方案中,本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以与西利珠单抗(MedImmune Inc.;国际公开号W0 02/098370)竞争性结合。西利珠单抗(MEDI-507)是CD2特异性大鼠抗体BTI-322的人源化型式(MedImmune Inc.;国际公开号W0 02/098370)。西利珠单抗是一种IgG1 κ 类单克隆抗体并且与人T细胞和人NK细胞上发现的CD2结合。西利珠单抗由两条重链($\sim$ 50kDa)和两条轻链($\sim$ 25kDa)组成。

[0076] 如本文所定义,表位是抗体或抗原结合片段结合的抗原区域。在一些实施方案中,表位可以是线性的。在其他实施方案中,表位可以是构象的。在一些实施方案中,表位可以由连续氨基酸形成。在其他实施方案中,表位可以由非连续氨基酸形成。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与CD2上的表位结合。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与CD2上和西利珠单抗相同的表位结合。在某些实施方案中,本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在适当的体外竞争性结合测定中与西利珠单抗竞争性结合,所述测定诸如Clark等人详述的测定,J ExpMed.1988年6月1日;167(6):1861-72。在某些实施方案中,本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)具有与西利珠单抗相同的IC₅₀值,

大约为1nM(Branco等人,Transplantation.1999年11月27日;68(10):1588-96)。在某些实施方案中,本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)具有比西利珠单抗更低的IC₅₀值。在某些实施方案中,本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)具有比西利珠单抗更高的IC₅₀值。在某些实施方案中,本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)具有0.5nM、0.6nM、0.7nM、0.8nM、0.9nM、1.0nM、1.1nM、1.2nM、1.3nM、1.4nM、1.5nM、0.5nM至0.8nM、0.6nM至0.9nM、0.7nM至1.0nM、0.8nM至1.1nM、0.9nM至1.2nM、1.0nM至1.3nM、1.1nM至1.4nM或1.2nM至1.5nM的IC₅₀值。

[0077] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的VH区的序列与SEQ ID NO:01有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的VL区的序列与SEQ ID NO:02有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的VH CDR1的序列可以是SEQ ID NO:03。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的VH CDR2的序列可以是SEQ ID NO:04。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的VH CDR3的序列可以是SEQ ID NO:05。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的VL CDR1的序列可以是SEQ ID NO:06。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的VL CDR2的序列可以是SEQ ID NO:07。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的VL CDR3的序列可以是SEQ ID NO:08。这些序列示于表1中。

[0078] 在某些实施方案中,与本文提供的方法一起使用的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)具有包含分别为SEQ ID NO:3-5的VH CDR和SEQ ID NO:2的VL的重链可变区。在某些实施方案中,与本文提供的方法一起使用的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)具有包含分别为SEQ ID NO:6-8的VL CDR和SEQ ID NO:1的VH的重链可变区。

[0079] 在某些实施方案中,与本文提供的方法一起使用的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)具有SEQ ID NO:3的重链可变区CDR 1;SEQ ID NO:4的重链可变区CDR 2;SEQ ID NO:5的重链可变区CDR 3;SEQ ID NO:6的轻链可变区CDR 1;SEQ ID NO:7的轻链可变区CDR 2;和SEQ ID NO:8的轻链可变区CDR 3。在某些实施方案中,与本文提供的方法一起使用的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)具有重链可变区CDR 1,其包含与SEQ ID NO:3至少约或约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列;重链可变区CDR 2,其包含与SEQ ID NO:4至少约或约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列;重链可变区CDR3,其包含与SEQ ID NO:5至少约或约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列;轻链可变区CDR 1,其包含与SEQ ID NO:6至少约或约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列;轻链可变区CDR 2,其包含与SEQ ID NO:7至少约或约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列;和/或轻链可变区CDR3,其包含与SEQ ID NO:8至少约或约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列。

[0080] 在某些实施方案中,与本文提供的方法一起使用的CD2结合分子(或抗CD2抗体或

其抗原结合片段)具有重链可变区CDR 1,其包含相对于SEQ ID NO:3具有约或至少约1个氨基酸取代、约或至少约2个氨基酸取代、约或至少约3个氨基酸取代、约或至少约4个氨基酸取代或多于至少约4个氨基酸取代的序列;重链可变区CDR 2,其包含相对于SEQ ID NO:4具有约或至少约1个氨基酸取代、约或至少约2个氨基酸取代、约或至少约3个氨基酸取代、约或至少约4个氨基酸取代或多于至少约4个氨基酸取代的序列;重链可变区CDR 3,其包含相对于SEQ ID NO:5具有约或至少约1个氨基酸取代、约或至少约2个氨基酸取代、约或至少约3个氨基酸取代、约或至少约4个氨基酸取代或多于至少约4个氨基酸取代的序列;轻链可变区CDR 1,其包含相对于SEQ ID NO:6具有约或至少约1个氨基酸取代、约或至少约2个氨基酸取代、约或至少约3个氨基酸取代、约或至少约4个氨基酸取代或多于至少约4个氨基酸取代的序列;轻链可变区CDR 2,其包含相对于SEQ ID NO:7具有约或至少约1个氨基酸取代、约或至少约2个氨基酸取代、约或至少约3个氨基酸取代、约或至少约4个氨基酸取代或多于至少约4个氨基酸取代的序列;和/或轻链可变区CDR 3,其包含相对于SEQ ID NO:8具有约或至少约1个氨基酸取代、约或至少约2个氨基酸取代、约或至少约3个氨基酸取代、约或至少约4个氨基酸取代或多于至少约4个氨基酸取代的序列。

[0081] 在一些实施方案中,氨基酸取代是保守性取代。保守性氨基酸交换的说明性实例是维持氨基酸侧链的结构和/或功能特性的氨基酸取代,例如,芳香族氨基酸被另一种芳香族氨基酸取代,酸性氨基酸被另一种酸性氨基酸取代,碱性氨基酸被另一种碱性氨基酸取代,以及脂肪族氨基酸被另一种脂肪族氨基酸取代。在一些实施方案中,保守性氨基酸取代是其中氨基酸残基被具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基置换。具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如,天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β -分支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。相反,非保守性氨基酸交换的实例是不维持氨基酸侧链的结构和/或功能特性的氨基酸取代,例如,芳香族氨基酸被碱性、酸性或脂肪族氨基酸取代,酸性氨基酸被芳香族、碱性或脂肪族氨基酸取代,碱性氨基酸被酸性、芳香族或脂肪族氨基酸取代,以及脂肪族氨基酸被芳香族、酸性或碱性氨基酸取代。

[0082] 在某些实施方案中,与本发明的方法和组合物一起使用的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)包含BTI-322或西利珠单抗的1、2或3个重链CDR。在某些实施方案中,与本发明的方法和组合物一起使用的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)包含BTI-322或西利珠单抗的1、2或3个轻链CDR。在某些实施方案中,与本发明的方法和组合物一起使用的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)包含BTI-322或西利珠单抗的1、2、3、4、5个或所有6个CDR。在某些实施方案中,与本文所述的方法一起使用的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)包含表1所列的1、2、3、4、5个或所有6个CDR。在某些实施方案中,BTI-322或西利珠单抗的1、2、3、4、5个和/或所有6个CDR具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代。在一个更具体的实施方案中,此类氨基酸取代是保守性氨基酸取代。

[0083] 表1:CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的序列

[0084]

描述	序列
VH 区 (SEQ ID NO: 01)	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYY MYWVRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFK KKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCARG KFNYRFAYWGQGTLVTVSS
VL 区 (SEQ ID NO: 02)	DVVMQTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLHSSGN TYLNWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSG SGSGTDFTLKISGVEAEDVGVYYCMQFTHYPYT FGQGTKLEIK
VH CDR 1 (SEQ ID NO: 03)	EYYMY
VH CDR 2 (SEQ ID NO: 04)	RIDPEDGSIDYVEKFKK
VH CDR 3 (SEQ ID NO: 05)	GKFNYRFAY
VL CDR 1 (SEQ ID NO: 06)	RSSQSLHSSGNTYLN
VL CDR 2 (SEQ ID NO: 07)	LVSKLES
VL CDR 3 (SEQ ID NO: 08)	MQFTHYPYT

[0085] 在某个实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)具有与西利珠单抗相同的六个CDR序列。在某个实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以共用西利珠单抗的六个CDR序列中的五个。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的CDR之一不同于西利珠单抗的对应CDR,并且该CDR序列有一个氨基酸不同。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的所述CDR序列与西利珠单抗的对应CDR之间的差异是保守性氨基酸取代。例如,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)相对于西利珠单抗的六个CDR的集合,或相对于西利珠单抗重链中的三个CDR的集合,或相对于西利珠单抗轻链中的三个CDR的集合,可以具有一个、两个、三个、四个、五个或六个保守性氨基酸取代。

[0086] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的VL CDR1、VL CDR2或VL CDR3是不同于其西利珠单抗对应物的CDR。在其他实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的VH CDR1、VH CDR2或VH CDR3是不同于其西利珠单抗对应物的CDR。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的不同CDR比其西利珠单抗对应物的序列更长。在其他实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的不同CDR比其西利珠单抗对应物的序列更短。

[0087] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的重链恒定区(CH)的序列与SEQ ID NO:09有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的重链恒定区的序列与SEQ ID NO:10有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的重链恒定区的序列与SEQ ID NO:11有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的重链恒定区的序列与SEQ ID NO:12有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的重链恒定区的序列与SEQ ID NO:13有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的轻链恒定区(CL)的序列与SEQ ID NO:14有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的轻链恒定区的序列与SEQ ID NO:15有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。

[0088] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可针对人CD2的三个区域,本领域称为T11₁、T11₂和T11₃(Peterson,A.,Seed,B.,1987.Nature329,842-846;Branco等人,1999.Transplantation 68,1588-1596;Arulanandam,A.R.等人,1993.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90,11613-11617;Damschroder等人,2004.Molecular Immunology 41,985-1000)。人CD2附着结构域中对其与西利珠单抗结合至关重要的三个残基是N18、K55和T5(Damschroder等人,2004.Molecular Immunology 41,985-1000)。在某些实施方案中,胞外CD2结构域中的残基N18、K55和T59是本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)对人CD2的结合亲和力至关重要的残基。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与西利珠单抗结合相同的表位。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与西利珠单抗竞争性地与人CD2结合。

[0089] 在某些实施方案中,可以修饰CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的DNA序列以优化制造期间的产物收率。序列优化将增加产物收率,而不会影响生产期间分子的产物质量分泌,因为生成的氨基酸序列将与表1中描述的相同。CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)重链和轻链的优化DNA序列呈现于表2中。

[0090] 表2:CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的优化序列

[0091]

描述	序列
优化的重链序列 (SEQ ID NO: 16)	CAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCTGAGGT GCAGAGACCCGGCGCCAGCGTCAAGGTGAGCT GTAAGGCCAGCGGCTACATCTTCACAGAATACTA CATGTACTGGGTGAGGCAAGCCCCCGGCCAAGG ACTGGAGCTGGTGGGCAGAATCGATCCAGAGG ATGGCAGCATCGACTACGTGGAGAAGTTCAAGA AGAAGGTGACTCTGACAGCCGACACAAGCAGCA GCACTGCTTACATGGAGCTGAGCTCTCTGACTA GCGATGACACTGCCGTGTACTACTGTGCTAGGG GCAAGTTCAACTATAGGTTTCGCCTACTGGGGCC AAGGCACTCTGGTGACAGTCAGCAGCGCTAGCA CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCCGTCTTACA GTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAGGTTGAGCCCAAATCTTG TGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCCAGCA CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCT TCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGA CGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCAT CCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG

[0092]

描述	序列
	CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCGGGTAAATGATGA
优化的轻链序列 (SEQ ID NO: 17)	GACGTGGTGATGACTCAGAGCCCTCCTTCTCTGC TGGTGACTCTGGGCCAGCCAGCCAGCATCAGCT GTAGGAGCAGCCAGTCTCTGCTGCACTCCAGCG GCAACACTTATCTGAACTGGCTGCTGCAGAGACC CGGCCAGAGCCCTCAGCCTCTGATCTACCTCGTG AGCAAGCTGGAGAGCGGCGTGCCAGATAGGTT TAGCGGCAGCGGAAGCGGCACTGACTTCACTCT GAAGATCAGCGGCGTGGAAGCTGAGGATGTGG GCGTCTACTACTGCATGCAGTTCACACACTACCC ATACACTTTCGGCCAAGGCACAAAGCTGGAAT CAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCGCCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCCAGGAGA GTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAG CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGTGATGA

[0093] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的重链的序列与SEQ ID NO:16有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的轻链的序列与SEQ ID NO:17有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。

[0094] 在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)干扰CD58/CD2信号级联。在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)阻断CD58。抑制CD58/CD2途径的化合物的实例是阿法西普(alefacept)。

[0095] 在某些实施方案中,西利珠单抗的耗竭型式可用于治疗自身免疫性疾病。

[0096] 5.1.2 ADCC活性降低或不存在

[0097] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)不具有抗体依赖性细胞毒性或具有降低的抗体依赖性细胞毒性(“ADCC”)。可以使用包括但不限于Fc沉默、亚类转换、去糖基化和Fc区的其他突变或修饰的方法来生成所述CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)以便表现出降低或不存在的ADCC。这些方法例如在美国

临时申请第63/135,381号中有描述,对于可用于本文所述的方法中的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的非限制性实例,其通过引用整体并入本文。这些方法还在5.1.4节、5.2.2节和5.2.3节中以及在实例中进行了进一步描述。

[0098] ADCC活性可以通过任何市售试剂盒来确定(参见,例如Promega ADCC Reporter Bioassay, Core Kit(目录号G7010、G7018)或任何适当的测定。此类测定可包括但不限于基于流式细胞术的测定、荧光测定或生物发光报告测定。

[0099] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)在体外测定中表现出西利珠单抗的至多90%的ADCC活性。此类测定的实例在Golay等人的方法中有描述,Haematologica.2003年1月;88:1002-1012。具体地,本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与西利珠单抗相比表现出至多0%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或至多90%的ADCC活性。

[0100] 在某些实施方案中,与在人源化小鼠模型或临床环境中的人类受试者中体内施用西利珠单抗相比,体内施用本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出至多90%的ADCC活性。具体地,与在人源化小鼠模型或临床环境中的人类受试者中体内施用西利珠单抗相比,体内施用本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出至多0%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或至多90%的ADCC活性。

[0101] 5.1.3免疫调控活性的保持

[0102] 在某些实施方案中,本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)尽管ADCC不存在或降低但表现出免疫调控活性。可以使用包括但不限于Fc沉默、亚类转换、去糖基化和Fc区的其他突变或修饰的方法来生成所述CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)以便表现出降低或不存在的ADCC。这些方法在5.1.4节、5.2.2节和5.2.3节中以及在实例中进行了进一步描述。

[0103] 本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出的免疫调控活性可包括但不限于抑制CD4⁺/CD25⁺T细胞的活化和增殖,增加FOXP3⁺调控性T细胞的百分比和阻抑CD69⁺NK细胞。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出与西利珠单抗相同的免疫调控活性(例如,相同类型和相同水平)。免疫调控活性的测定可以通过本领域已知的任何适当的方法来实现。这些方法可以包括但不限于细胞增殖测定、T细胞活化功能测定、ELISPOT测定、细胞内染色、细胞因子捕获、四聚体染色、光谱分型测定和生物传感器测定。例如,T细胞活化可以通过任何市售的测定试剂盒(参见,例如Promega T Cell Activation Bioassay(NFAT或IL-2)(目录号J1621或J1651)),或任何适当的测定来确定,其中简单地用抗CD3抗体包被测定板,添加人PBMC或小鼠外周靶细胞,将抗CD28添加到细胞中,并对增殖进行量化。

[0104] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以抑制CD4⁺/CD25⁺T细胞的活化和增殖,达到是体外测定中西利珠单抗所达到的水平的至少50%的水平。此类测定的实例在Ng等人的方法中有描述,Blood.2001;98:2736-2744。具体地,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以抑制体外CD4⁺/CD25⁺T细胞的活化和增殖,达到为西利珠单抗所达到的水平的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的水平。

[0105] 在某些实施方案中,与在人源化小鼠模型或临床环境中的人类受试者中体内施用西利珠单抗相比,体内施用本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出至少50%的CD4+/CD25+T细胞活化/增殖水平。具体地,与在人源化小鼠模型或临床环境中的人类受试者中体内施用西利珠单抗相比,体内施用本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的CD4+/CD25+T细胞活化/增殖水平。

[0106] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与西利珠单抗相比可以增加FOXP3⁺调控性T细胞的量。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以增加FOXP3⁺调控性T细胞的水平,达到在体外测定中西利珠单抗所达到的量的至少50%的水平。此类测定的实例在Sambucci等人的方法中有描述,Scientific Reports.8:3674(2018)。具体地,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以增加体外FOXP3⁺调控性T细胞的量,达到为西利珠单抗所达到的FOXP3⁺调控性T细胞的量的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的水平。

[0107] 在某些实施方案中,与在人源化小鼠模型或临床环境中的人类受试者中体内施用西利珠单抗相比,体内施用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出至少50%的FOXP3⁺调控性T细胞水平。具体地,与在人源化小鼠模型或临床环境中的人类受试者中体内施用西利珠单抗相比,体内施用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的FOXP3⁺调控性T细胞水平。

[0108] 在某些实施方案中,与西利珠单抗相比,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以抑制CD69+NK细胞的表达。在某些实施方案中,本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)在体外测定中与西利珠单抗相比表现出至多50%的CD69+NK细胞表达。此类测定的实例在Thum等人的方法中有描述,Human Reproduction.19:10,第2395-2400页,2004。具体地,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与西利珠单抗相比表现出至多10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或至多90%的体外CD69+NK细胞表达。

[0109] 在某些实施方案中,与在人源化小鼠模型或临床环境中的人类受试者中体内施用西利珠单抗相比,体内施用本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出至多50%的CD69+NK细胞表达。具体地,与在人源化小鼠模型或临床环境中的人类受试者中体内施用西利珠单抗相比,体内施用本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出至多10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或至多90%的CD69+NK细胞表达。

[0110] 在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以执行这些免疫调控活性中的一种。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以执行这些免疫调控活性中的一种以上。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以执行这些免疫调控活性中的全部。在一个具体实施方案中,施用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)完全废除了受者中的ADCC活性,同时保留了免疫调控活性。

[0111] 5.1.4Fc区的修饰

[0112] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是IgG1抗体并且在Fc区中具有修饰。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是IgG2抗体并且在Fc区中具有修饰。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是IgG3抗体并且在Fc区中具有修饰。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是IgG4抗体并且在Fc区中具有修饰。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与西利珠单抗相比包含至少一个突变(例如,约或至少一个、约或至少两个、约或至少三个、约或至少四个、约或至少五个、约或至少六个、约或至少七个、约或至少八个、约或至少九个、约或至少十个或多于约十个突变)。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)相对于西利珠单抗包含约一个突变、约两个突变、约三个突变、约四个突变、约五个突变、约六个突变、约七个突变、约八个突变、约九个突变、约十个突变或多于约十个突变(例如,西利珠单抗的Fc区中的突变)。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)在IgG1重链中包含西利珠单抗CDR并且包含至少一个突变(例如,约或至少一个、约或至少两个、约或至少三个、约或至少四个、约或至少五个、约或至少六个、约或至少七个、约或至少八个、约或至少九个、约或至少十个或多于约十个突变)。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)在IgG2重链中包含西利珠单抗CDR并且包含至少一个突变(例如,约或至少一个、约或至少两个、约或至少三个、约或至少四个、约或至少五个、约或至少六个、约或至少七个、约或至少八个、约或至少九个、约或至少十个或多于约十个突变)。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)在IgG3重链中包含西利珠单抗CDR并且包含至少一个突变(例如,约或至少一个、约或至少两个、约或至少三个、约或至少四个、约或至少五个、约或至少六个、约或至少七个、约或至少八个、约或至少九个、约或至少十个或多于约十个突变)。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)在IgG4重链中包含西利珠单抗CDR并且包含至少一个突变(例如,约或至少一个、约或至少两个、约或至少三个、约或至少四个、约或至少五个、约或至少六个、约或至少七个、约或至少八个、约或至少九个、约或至少十个或多于约十个突变)。突变可以由与野生型对应物相比CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的氨基酸序列中的至少一个改变组成,其中所述改变导致Fc区与其同源受体的结合的减少或消除。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括氨基酸位置L234、L235、P329、V234、G237、P238、H268、V309、A330、P331和/或S228(例如,基于Edelman(EU)编号)的突变。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括氨基酸位置L234和/或L235的突变。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括氨基酸位置L234、L235和/或P329的突变。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括氨基酸位置V234、G237、P238、H268、V309、A330和/或P331的突变。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括氨基酸位置S228的突变。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括氨基酸位置S228、P329和/或L235的突变。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括L234A(或另一保守性氨基酸突变)。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括L235A(或另一保守性氨基酸突变)。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括P329G(或另一保守性氨基酸突变)。在一些实施方

案中,突变是一种或多种突变并且包括V234A(或另一保守性氨基酸突变)。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括G237A(或另一保守性氨基酸突变)。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括P238S(或另一保守性氨基酸突变)。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括H268A(或另一保守性氨基酸突变)。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括V309L(或另一保守性氨基酸突变)。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括A330S(或另一保守性氨基酸突变)。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括P331S(或另一保守性氨基酸突变)。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括S228P(或另一保守性氨基酸突变)。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括L235E(或另一保守性氨基酸突变)。在一些实施方案中,突变包括L234A和L235A(或其他保守性氨基酸突变)。在一些实施方案中,突变包括P329G、L234A和L235A(或其他保守性氨基酸突变)。在一些实施方案中,突变包括V234A、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S和P331S(或其他保守性氨基酸突变)(例如,对于IgG2而言)。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括S228P(或另一保守性氨基酸突变)(例如,对于IgG4而言)。在一些实施方案中,突变是一种或多种突变并且包括P329G、S228P和L235E(或另一保守性氨基酸突变)(例如,对于IgG4而言)。在一些实施方案中,氨基酸位置是基于任何抗体编号方案(例如,Edelman(EU)编号)的位置。在一些实施方案中,氨基酸位置是基于Edelman(EU)编号的位置。在一些实施方案中,氨基酸位置是基于Kabat编号方案的位置。在一些实施方案中,氨基酸位置是基于Clothia编号方案的位置。在一些实施方案中,氨基酸位置是基于IMGT编号方案的位置。修饰可以由与野生型Fc区相比CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)Fc区的氨基酸序列中的至少一个改变组成,其中所述改变导致Fc区与其同源受体的结合的减少或消除。Fc受体位于免疫效应细胞上,包括B细胞、NK细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞。不受理论的束缚,在野生型IgG中,Fc与Fc受体(FcR)的相互作用导致下游效应细胞功能,包括刺激免疫细胞的吞噬或细胞毒性活性。Fc/FcR相互作用的减少或消除导致效应子功能的消除。

[0113] 在某些实施方案中,与西利珠单抗相比,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出与Fc γ RIIIA受体的结合减少。在某些实施方案中,与西利珠单抗相比,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出与Fc γ RIIA受体的结合减少。在某些实施方案中,与西利珠单抗相比,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出与Fc γ RI受体的结合减少。在某些实施方案中,与西利珠单抗相比,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出与Fc γ RIIIA受体的结合增加。在某些实施方案中,与西利珠单抗相比,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出与Fc γ RIIA受体的结合增加。在某些实施方案中,与西利珠单抗相比,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)表现出与Fc γ RI受体的结合增加。在某些实施方案中,如本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)以西利珠单抗所表现出的结合能力的0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%结合。在某些实施方案中,如本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)具有与西利珠单抗所表现出的结合能力(例如,与Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA和/或Fc γ RI结合)相比,高约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的结合能力(例如,与Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA和/或Fc γ RI

结合)。在某些实施方案中,如本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)具有与西利珠单抗所表现出的结合能力(例如,与Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA和/或Fc γ RI结合)相比,低约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的结合能力(例如,与Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA和/或Fc γ RI结合)。检测结合事件的测定可包括但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)和/或表面等离子体共振(SPR)方法,诸如Biacore系统。

[0114] 在某些实施方案中,Fc区可以通过本领域已知的任何适当的方法进行修饰。在某些实施方案中,修饰可导致Fc沉默。在某些实施方案中,修饰可以包括IgG Fc的氨基酸序列的突变。在某些实施方案中,修饰可以包括糖基化位点(N297)的突变或包含N297的共有序列的突变。在某些实施方案中,修饰可以包括抑制Fc γ R和C1q结合的突变。在某些实施方案中,这些突变可以包括突变K322A、L234A和L235A中的任何或所有突变。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以是Fab,其中不存在Fc。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是IgG4抗体。不受理论的束缚,由于缺乏包括ADCC在内的效应子功能,IgG4亚类对于治疗目的而言是理想的(Davies和Sutton,Immunol Rev.2015年11月;268(1):139-15)。在某些实施方案中,如本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是IgG2抗体。不受理论的束缚,IgG2亚类的治疗有益特征包括IgG2不穿过胎盘(Einarsdottir等人,PLoS One.2014Sep 24;9(9):e108319)并且IgG2具有非常低/没有Fc受体结合能力(Vidarsson等人,Front Immunol.2014;5:520)。

[0115] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以具有抗原结合可变区和Fc区。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的Fc区在抗体的每条重链中都含有糖基化共有序列。在某些实施方案中,糖基化共有序列是Asn-X-Ser。在某些实施方案中,糖基化共有序列是Asn-X-Thr。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)在Asn297处被糖基化。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)已经去糖基化。在某些实施方案中,附接到天冬酰胺残基的聚糖可以是N-连接的聚糖。在某些实施方案中,附接到天冬酰胺残基的聚糖可以是O-连接的聚糖。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在重链的Asn297上含有单个N-连接的糖基化位点。

[0116] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在Fc糖基化共有序列处被糖基化。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)去糖基化。在某个实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的去糖基化是通过修饰Fc区,特别是通过引入位置N297的点突变来实现的。在某个实施方案中,在位置297(N297)引入的突变可以是但不限于N297G、N297Q或N297A。不受理论的束缚,N297点突变将导致缺乏糖基化和Fc信号传导的沉默。在某个实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的去糖基化是通过CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)聚糖结构的化学或酶促降解实现的;参见5.2.3节。在一个具体实施方案中,聚糖降解的化学或酶促方法保持了Fc氨基酸序列。

[0117] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的

恒定区可以与不同亚类的抗体的恒定区转换。不受理论的束缚,虽然可变区不改变,但亚类转换抗体在与不同效应分子相互作用的同时保留其特定亲和力 (Valenzuela和Schaub, Transplantation. 2018年1月;102 (1S增刊1):S7-S13)。在某个实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的恒定区可以与不同抗体的恒定区转换。在某个实施方案中,该转换将导致CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)变成与其原来不同的抗体亚类。在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的恒定区可以与不同的抗体转换,同时保持可变区的特异性结合。在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的恒定区可以与不同的抗体转换并且特定可变区被保留,其中CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的VH区与SEQ ID NO:01有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一,并且CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的VL区的序列与SEQ ID NO:02有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。

[0118] 在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与人CD2中和西利珠单抗相同的表位特异性结合。在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以是动物特异性抗体、人特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全长抗体、抗体片段、单链可变片段(scFv)、天然存在的抗体、合成抗体、工程化抗体、扩大的抗CD2变体(其中向Fc区添加了附加组分(例如,组分可以包括scFv、CH2结构域和/或CH3结构域))或其组合。在某些实施方案中,抗体Fc区具有导致Fc沉默的点突变(例如,在N297中)。在某些实施方案中,所述抗体是IgG1。在某些实施方案中,所述抗体是IgG2。在某些实施方案中,所述抗体是IgG4。在某些实施方案中,所述抗体具有与西利珠单抗不同的天然恒定区。在某些实施方案中,所述抗体具有与西利珠单抗不同的天然恒定区和所述Fc区中引起Fc沉默的点突变。在一些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是人源化的抗CD2单克隆抗体。在一个具体实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是西利珠单抗。在某些实施方案中,如本文所述的抗CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以具有经修饰的Fc区,其中修饰可以包括但不限于导致Fc沉默的点突变,转换的天然恒定区,或Fc沉默转换的新天然恒定区。不同抗体亚类和修饰的这些组合产生表3中概述的不同型式的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以是IgG1、IgG2或IgG4抗体亚类。在某些实施方案中,如本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以具有经修饰的Fc区,其中修饰可以包括但不限于导致Fc沉默的点突变,转换的天然恒定区,或Fc沉默转换的新天然恒定区。这些不同抗体亚类和修饰的组合产生表3中概述的不同型式的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。

[0119] 表3:CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的型式的实例

[0120]	IgG 亚类	CD2 结合分子(或抗 CD2 抗体或其抗原结合片段)的修饰
	IgG1	导致沉默 Fc 的点突变
	IgG1	相同的可变区, 但与不同的天然恒定区组合
	IgG1	相同的可变区, 但与 Fc 沉默的新天然恒定区组合
	IgG2	相同的可变区, 但与不同的天然恒定区组合
	IgG2	相同的可变区, 但与 Fc 沉默的新天然恒定区组合
	IgG4	相同的可变区, 但与不同的天然恒定区组合

[0121]	IgG 亚类	CD2 结合分子(或抗 CD2 抗体或其抗原结合片段)的修饰
	IgG4	相同的可变区, 但与 Fc 沉默的新天然恒定区组合

[0122] 在表4中概述了CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的比较。

[0123] 表4:CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的比较

[0124]	分子	VH 区:	VL 区:	去糖基化	Fc 修饰	IgG 亚类
	CD2 结合分子 1	SEQ ID NO: 01	SEQ ID NO: 02	是	无	IgG1
	CD2 结合分子 2	SEQ ID NO: 01	SEQ ID NO: 02	否	LALA-PG 突变	IgG1
	CD2 结合分子 3	SEQ ID NO: 01	SEQ ID NO: 02	否	V234A、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S、P331S	IgG2
	CD2 结合分子 4	SEQ ID NO: 01	SEQ ID NO: 02	否	S228P、L235E、P329G	IgG4

[0125] 在某些实施方案中,与西利珠单抗相比,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)(包括上文呈现的实例)几乎没有ADCC活性,但保留了西利珠单抗所表现出的免疫调控作用。

[0126] 在某些实施方案中,本文提供的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以具有比未修饰的IgG1抗体的分子量更高的分子量。在某些实施方案中,这种分子量的增加可以通过添加分子的重复区域来实现。在某些实施方案中,这些区域可以通过本领域已知的此类方式附接至CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段),诸如但不限于化学缀合、重组融合和共价附接。

[0127] 在某些实施方案中,要附接到CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的附加区域可以包括但不限于分子的重复区域,诸如附加可变重链(VH)、附加可变轻链(VL)、包含附加VH和附加VL的融合体的scFv、附加CH2结构域或附加CH3结构域。在某些实施方案中,

附加区域可以附接到CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的Fc区。

[0128] 在某些实施方案中,scFv可以附接到CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的Fc区。在某些实施方案中,scFv可包含西利珠单抗的VH和VL的融合体。在某些实施方案中,scFv可包含VH和VL的融合体,其中VH可包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,其中VL可包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在一个具体实施方案中,scFv与CD2结合。在某个实施方案中,scFv的CDR与西利珠单抗的CDR相同。在某些实施方案中,附接到本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的Fc区的scFv与CD2上的表位结合。在某些实施方案中,附接到本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的Fc区的scFv与CD2上和西利珠单抗相同的表位结合。在某些实施方案中,scFv可以从IgG2抗体或IgG4抗体生成。

[0129] 在某些实施方案中,附加CH2结构域可以附接到Fc。在某些实施方案中,所述CH2结构域可以包含与SEQ ID NO:18或19的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的氨基酸序列。在某些实施方案中,附加CH2结构域可以从IgG2抗体或IgG4抗体生成。在某些实施方案中,附加CH3结构域可以附接到Fc。在某些实施方案中,所述CH3结构域可以包含与SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的氨基酸序列。在某些实施方案中,附加CH3结构域可以从IgG2抗体或IgG4抗体生成。在某个实施方案中,附加结构域可以附接到Fc的C末端。在某些实施方案中,所述结构域可以通过本领域已知的此类方式附接至CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段),诸如但不限于化学缀合、重组融合和共价附接。在某些实施方案中,所述结构域可以通过本领域已知的此类方式附接至CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段),诸如但不限于化学缀合、重组融合和共价附接。可用于其公开和产生的CD2抗体或其抗原结合片段的实例描述于例如美国临时申请第63/042,844号,其通过引用整体并入本文。

[0130] 5.2CD2结合分子的产生

[0131] 本文提供了用于产生本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的方法,其中相对于西利珠单抗,所述分子介导抗体依赖性细胞毒性的能力降低或消除,而所述分子的免疫调控活性得以维持。用于产生本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的方法包括重组表达技术、选择方法、转化到宿主细胞中和纯化CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段);参见5.2.1节。本文还提供了用于产生CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的片段的方法;参见5.2.2节,去糖基化的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段);参见5.2.3节,以及包含用于重组表达本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的载体的细胞;参见5.2.4节。

[0132] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可包含SEQ ID NO:01的VH、SEQ ID NO:02的VL、SEQ ID NO:09的CH和SEQ ID NO:14的CL;SEQ ID NO:01的VH、SEQ ID NO:02的VL、SEQ ID NO:10的CH和SEQ ID NO:14的CL;SEQ ID NO:01的VH、SEQ ID NO:02的VL、SEQ ID NO:11的CH和SEQ ID NO:14的CL;SEQ ID NO:01的VH、SEQ ID NO:02的VL、SEQ ID NO:12的CH和SEQ ID NO:14的CL;或SEQ ID NO:01的VH、SEQ ID NO:02的VL、SEQ ID NO:13的CH和SEQ ID NO:14的CL。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可包含SEQ ID NO:01的VH、SEQ ID NO:02的VL、SEQ ID NO:09的CH和SEQ ID NO:15的CL;SEQ ID NO:01的VH、SEQ ID NO:02的VL、SEQ ID NO:10

的CH和SEQ ID NO:15的CL;SEQ ID NO:01的VH、SEQ ID NO:02的VL、SEQ ID NO:11的CH和SEQ ID NO:15的CL;SEQ ID NO:01的VH、SEQ ID NO:02的VL、SEQ ID NO:12的CH和SEQ ID NO:15的CL;或SEQ ID NO:01的VH、SEQ ID NO:02的VL、SEQ ID NO:13的CH和SEQ ID NO:15的CL。

[0133] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可包含SEQ ID NO:16的重链;SEQ ID NO:02的VL和SEQ ID NO:14的CL;SEQ ID NO:16的重链;SEQ ID NO:02的VL和SEQ ID NO:15的CL;SEQ ID NO:01的VH;SEQ ID NO:09的CH;以及SEQ ID NO:17的轻链;SEQ ID NO:01的VH;SEQ ID NO:10的CH;以及SEQ ID NO:17的轻链;SEQ ID NO:01的VH;SEQ ID NO:11的CH;以及SEQ ID NO:17的轻链;SEQ ID NO:01的VH;SEQ ID NO:12的CH;以及SEQ ID NO:17的轻链;SEQ ID NO:01的VH;SEQ ID NO:13的CH;以及SEQ ID NO:17的轻链;或SEQ ID NO:16的重链和SEQ ID NO:17的轻链。

[0134] 在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可包含扩大的变体。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的Fc包含附加区域,使得CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的分子量增加10kDa、11kDa、12kDa、13kDa、14kDa、15kDa、16kDa、17kDa、18kDa、19kDa、20kDa、21kDa、22kDa、23kDa、24kDa、25kDa、26kDa、27kDa、28kDa、29kDa、30kDa、31kDa、32kDa、33kDa、34kDa、35kDa、36kDa、37kDa、38kDa、39kDa、40kDa、41kDa、42kDa、43kDa、44kDa、45kDa、46kDa、47kDa、48kDa、49kDa、50kDa、51kDa、52kDa、53kDa、54kDa、55kDa、56kDa、57kDa、58kDa、59kDa或60kDa。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的Fc包含附加区域,使得CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的分子量增加10kDa至15kDa、11kDa至16kDa、12kDa至17kDa、13kDa至18kDa、14kDa至19kDa、15kDa至20kDa、16kDa至21kDa、17kDa至22kDa、18kDa至23kDa、19kDa至24kDa、20kDa至25kDa、21kDa至26kDa、22kDa至27kDa、23kDa至28kDa、24kDa至29kDa、25kDa至30kDa、26kDa至31kDa、27kDa至32kDa、28kDa至33kDa、29kDa至34kDa、30kDa至35kDa、31kDa至36kDa、32kDa至37kDa、33kDa至38kDa、34kDa至39kDa、35kDa至40kDa、36kDa至41kDa、37kDa至42kDa、38kDa至43kDa、39kDa至44kDa、40kDa至45kDa、41kDa至46kDa、42kDa至47kDa、43kDa至48kDa、44kDa至49kDa、45kDa至50kDa、46kDa至51kDa、47kDa至52kDa、48kDa至53kDa、49kDa至54kDa、50kDa至55kDa、51kDa至56kDa、52kDa至57kDa、53kDa至58kDa、54kDa至59kDa或55kDa至60kDa的范围。

[0135] 在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的重复区域可以附接到所述分子以产生扩大的变体。在某些实施方案中,这些区域可以通过本领域已知的此类方式附接至CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的Fc区,诸如但不限于化学缀合、重组融合和共价附接。

[0136] 在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的放大变体可源自IgG1、IgG₂或IgG₄。在某些实施方案中,附加scFv可以附接到CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的Fc上以产生放大的变体(图7、图8A)。在某些实施方案中,所述scFv可包含VH和VL,其中VH可包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的氨基酸序列,并且其中VL可包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的氨基酸序列。

[0137] 在某些实施方案中,附加CH2结构域可以附接到CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的Fc上以产生放大的变体(图7、图8B)。在某些实施方案中,附加CH2结构域可以包含与SEQ ID NO:18或19的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的氨基酸序列。在某些实施方案中,附加CH3结构域可以附接到CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的Fc上以产生放大的变体(图7、图8C)。在某些实施方案中,附加CH3结构域可以包含与SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的氨基酸序列。在一个优选实施方案中,附加片段或结构域可以附接到Fc的C末端。在某些实施方案中,放大的抗CD2变体可以是IgG2抗体。在某些实施方案中,放大的抗CD2变体可以是IgG4抗体。放大的抗CD2变体的详细信息示于表5中。

[0138] 在某些实施方案中,附接到CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的附加区域可包含无关的或人工的氨基酸序列。在某些实施方案中,附接到CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的附加区域可包含来自另一人类蛋白质的片段,诸如结构域。在某些实施方案中,附接到CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的附加区域可包含来自另一人类蛋白质的结构域的片段。在某些实施方案中,添加此类附加区域不干扰亲本CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的结合活性和/或相对于亲本CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)在人类中不会增加所得抗CD2结合剂的免疫原性。

[0139] 表5:扩大的抗CD2变体

[0140]

描述	IgG亚类	附加抗体组分	理论蛋白重量
分子5A	IgG2	scFv	199.4kDa
分子5B	IgG4	scFv	199.6kDa
分子6A	IgG2	CH2结构域	170.1kDa
分子6B	IgG4	CH2结构域	170.3kDa
分子7A	IgG2	CH3结构域	171.2kDa
分子7B	IgG4	CH3结构域	171.4kDa

[0141] 5.2.1重组表达系统

[0142] 本文描述了用于产生CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的方法。本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以通过本领域已知的任何适当的表达方法产生。这些产生抗体的方法可以包括但不限于使用杂交瘤细胞、细菌、酵母细胞、昆虫细胞、转基因动物、转基因植物、噬菌体展示、核糖体展示和在哺乳动物细胞系中的重组表达。在某些实施方案中,产生与西利珠单抗在相同表位处结合CD2的重组抗体的方法可包括抗体的VH和VL基因的分离、扩增和克隆;将重和轻片段连接在一起;然后将链克隆到特殊的噬菌体载体中。整合后,抗体被展示在细胞表面并且可以使用本领域已知的任何适当的选择方法来选择具有所需结合特异性的抗体。这些方法可以包括但不限于淘选、使用顺磁珠粒、荧光激活细胞分选(FACS)、酶联免疫吸附测定(ELISA)和/或表面等离子体共振(SPR)方法,诸如Biacore系统。

[0143] 选择后,抗体的基因可以转移到表达载体中。在某些实施方案中,还将强启动子插入到表达载体中。启动子可以是病毒启动子,诸如CMV或SV40;或非病毒启动子,诸如延伸因子(EF)-1启动子、UBC、PGK或CAG启动子。将表达载体转化到宿主细胞系中并整合到宿主细胞基因组中。在某些实施方案中,宿主细胞系可包括细菌、酵母或哺乳动物细胞系。在一个

具体实施方案中,可用作重组抗体产生的宿主细胞系的哺乳动物细胞系包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系、NS0细胞系、Sp2/0细胞系、PER.C6细胞系和人胚肾(HEK)细胞系。

[0144] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以从宿主细胞培养物中回收并通过本领域已知的任何适当的方法纯化。标准的抗体纯化方法包括但不限于蛋白-A亲和色谱法、Q-琼脂糖阴离子交换色谱法、磺丙基-琼脂糖阳离子交换色谱法、高效液相色谱法(HPLC)、蛋白G纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸萃取、磷酸纤维素色谱法、疏水相互作用色谱法、亲和色谱法、羟磷灰石色谱法和凝集素色谱法。

[0145] 5.2.2CD2结合片段的产生

[0146] 除了上述程序步骤外,还可以采取修改或其他步骤来产生CD2结合片段。这些CD2结合分子片段(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可包括但不限于Fab、F(ab')₂、scFv和sdAb。在具体实施方案中,产生的片段和西利珠单抗与相同的表位结合。在某些实施方案中,除了接头以外,产生结合CD2的scFv的程序还包括分离、扩增和克隆抗体的VH和VL基因。需要柔性肽接头来连接VH和VL片段。在某些实施方案中,产生结合CD2的sdAb的程序包括分离、扩增和克隆骆驼或鲨鱼VH区,这导致缺少配对VL区的单一VH区附接到恒定区。

[0147] 在某些实施方案中,可以用木瓜蛋白酶处理本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)以产生Fab结合片段。在某些实施方案中,可以用木瓜蛋白酶处理本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)以产生F(ab')₂。在一个具体实施方案中,本文所述的Fab、F(ab')₂、scFv或sdAb的VH区的序列与SEQ ID NO:01有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。在一个具体实施方案中,本文所述的Fab、F(ab')₂、scFv或sdAb的VL区的序列与SEQ ID NO:02有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。

[0148] 5.2.3CD2结合抗体的去糖基化

[0149] 本文描述了用于产生5.1.4节中描述的去糖基化CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的方法。在一些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的聚糖可以使用化学方法修饰,诸如用三氟甲磺酸(TFMS)处理。在另一个实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的聚糖可以使用酶法进行修饰。在一个具体实施方案中,聚糖降解的化学或酶促方法保持了本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的Fc氨基酸序列。

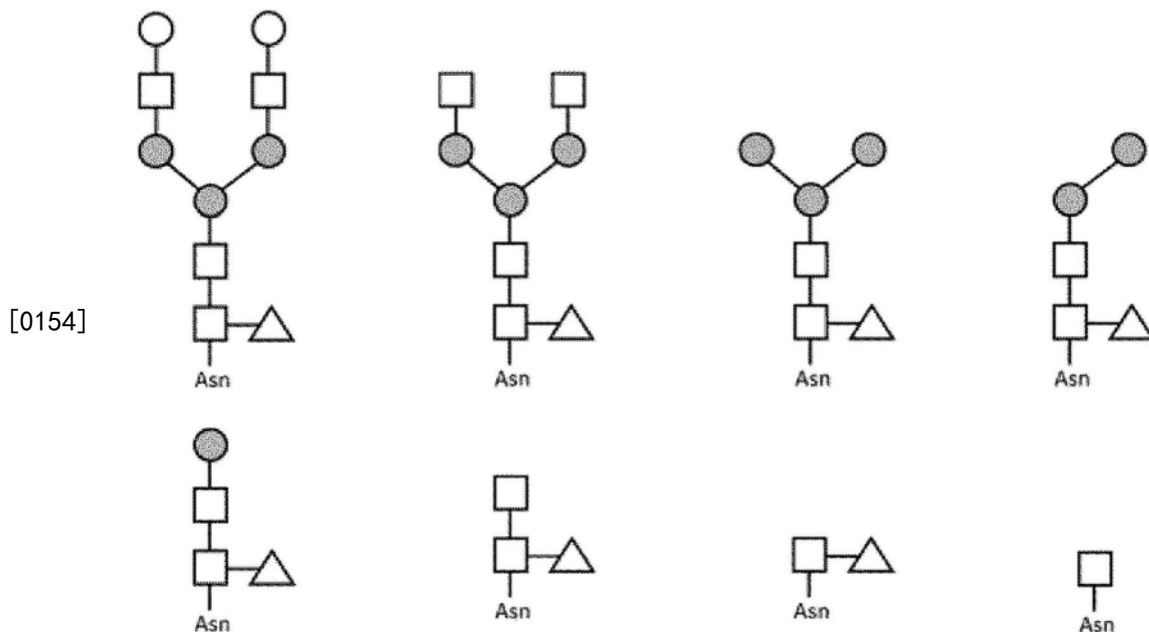
[0150] 可用于修饰本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的聚糖的酶可包括但不限于肽-N-糖苷酶F(PNG酶F)、肽-N-糖苷酶A(PNG酶A)、糖苷内切酶H、糖苷内切酶F、内切-β-N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶(EndoS)、内切-α-N-乙酰氨基半乳糖苷酶、唾液酸酶A、β1-4半乳糖苷酶S、β-N-乙酰氨基己糖苷酶和EndoS2。在某个实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)用糖苷内切酶处理。在一个具体实施方案中,用于降解本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的聚糖结构的糖苷内切酶是EndoS(Sjogren等人,Glycobiology,2015年第25卷第10期,1053-1063)。在一个具体实施方案中,用于降解本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的聚糖结构的糖苷内切酶是EndoS2(Sjogren等人,Biochem.J.(2013)455,107-118)。

[0151] 从酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)分泌的EndoS和EndoS2从人IgG重链的壳二糖核特异性去除N-连接的聚糖。与来自酿脓链球菌的糖苷内切酶EndoS2一起孵育导致

N-聚糖的壳二糖核中的两个GlcNAc残基之间的裂解,同时使核GlcNAc完好。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子用EndoS或EndoS2处理。EndoS和EndoS2都去除复杂聚糖,而EndoS2去除高甘露糖聚糖。

[0152] 在某个实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是IgG抗体。在某些实施方案中,本文所述的所述CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)具有重链恒定区的至少一个共有N-连接的糖基化位点。在某些实施方案中,本文所述的所述CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)携带方案1中所示的以下寡糖中的至少一种。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)用EndoS处理。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)用EndoS2处理。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)去糖基化。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是IgG抗体,其中相对于西利珠单抗,所述抗体介导抗体依赖性细胞毒性的能力降低或消除,而所述抗体的免疫调控活性得以维持。

[0153] 方案1:



[0155] 其中:空白三角形:岩藻糖;空白正方形:N-乙酰葡萄糖胺;灰色圆圈:甘露糖;以及空白圆圈:半乳糖。

[0156] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子的去糖基化可以通过本领域已知的任何适当的方法来确定。确定去糖基化的标准方法包括但不限于尺寸排阻色谱分析、三级结构分析、热稳定性评估、盐酸胍诱导变性、木瓜蛋白酶消化抗性以及通过液体色谱法-质谱法(LC-MS)测量的重链约化质量数据。

[0157] 5.2.4细胞和载体

[0158] 本文提供了表达如本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的细胞。本文提供了重组表达本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的离体细胞。本文还提供了包含编码如本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的核苷酸序列的表达载体。在一个具体实施方案中,所述细胞是离体细胞。

[0159] 在某些实施方案中,基因表达可以置于启动子的控制之下。启动子可以是病毒启动子,诸如CMV或SV40;或非病毒启动子,诸如延伸因子(EF)-1启动子、UBC、PGK或CAG启动子。在某些实施方案中,将编码本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的核苷酸序列克隆到适当的载体中。在某些实施方案中,所述载体可以是哺乳动物载体。在某些实施方案中,所述载体可以是病毒载体。在某些实施方案中,将表达载体转化到细胞(例如离体细胞)中。在某些实施方案中,细胞表达载体,使得核苷酸序列被宿主细胞转录和翻译。在某些实施方案中,宿主细胞系可包括细菌、酵母或哺乳动物细胞系。在一个具体实施方案中,宿主细胞系是哺乳动物细胞。在某个实施方案中,可用作重组抗体产生的宿主细胞系的哺乳动物细胞系包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系、NS0细胞系、Sp2/0细胞系、PER.C6细胞系和人胚肾(HEK)细胞系。

[0160] 在某些实施方案中,宿主细胞系可以被遗传修饰。在某些实施方案中,可以提高重组蛋白表达的生产率为目标进行修饰。在某些实施方案中,可以进行修饰以作用于宿主细胞表达的重组蛋白。在一个具体实施方案中,宿主细胞系已被遗传修饰以表达所需的糖基转移酶。在一个具体实施方案中,宿主细胞系已被遗传修饰以表达EndoS或EndoS2。

[0161] 5.3治疗用途及方法

[0162] 本文提供了使用如本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的方法,其中相对于西利珠单抗,所述分子介导抗体依赖性细胞毒性的能力降低或消除,而所述分子的免疫调控活性得以维持。本文提供了治疗患有免疫系统的慢性或急性炎症性病症的人类受试者的方法。本文还提供了用于预防人类受试者发展免疫系统的慢性或急性炎症性病症的方法。在其他实施方案中,免疫系统的急性或慢性病症可以是但不限于移植物抗宿主病(GVHD)、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、1型糖尿病、银屑病、溃疡性结肠炎、炎症性肠病(克罗恩氏病)、乳糜泻、舍格伦氏病、狼疮、多发性硬化、局灶性节段性肾小球硬化、特应性皮炎、肌萎缩性侧索硬化、原发性胆汁性肝硬化以及原发性硬化性胆管炎和严重哮喘。在某些实施方案中,所述方法包括向患有免疫系统的慢性或急性炎症性病症的人类受试者施用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)或包含本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的药物组合物。在某些实施方案中,将本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)或包含本文所述的CD2结合分子的药物组合物长期施用于患者。

[0163] 本文还提供了用于治疗正在接受器官或骨髓移植手术的人类受试者的方法。在某些实施方案中,所述方法包括将本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)施用至待移植的器官。在某些实施方案中,所述方法包括向人类受试者施用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)或包含本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的药物组合物。

[0164] 本文提供的方法可包括向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂。在一些实施方案中,向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂以预防或治疗受试者的免疫相关病症或疾病。在一些实施方案中,本文提供的方法包括向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段、CTLA-4共刺激阻滞剂和另一种活性剂。在一些实施方案中,受试者已被诊断患有至少一种免疫相关病症或疾病。在一些实施方案中,受试者具有至少一种与免疫相关病症或疾病相关的症状。在一些实施方案中,本文提供的

方法用于预防免疫相关病症或疾病在受试者中发生。本文提供的方法还可以包括通过向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂来维持对移植受试者的免疫耐受。在一些实施方案中,受试者易患或可能发展免疫相关病症或疾病。在一些实施方案中,受试者已被诊断患有、可能发展至少一种免疫相关病症或疾病、至少两种、至少三种、至少四种或多于至少四种免疫相关病症或疾病,或具有与之相关的症状。在一些实施方案中,免疫相关病症或疾病是免疫系统的急性或慢性病症。

[0165] 在一些实施方案中,抗CD2抗体或其抗原结合片段在向受试者施用CTLA-4共刺激阻滞剂之前、同时或之后向受试者施用。在一些实施方案中,第一剂抗CD2抗体或其抗原结合片段在向受试者施用第一剂CTLA-4共刺激阻滞剂之前、同时或之后向受试者施用。治疗剂(例如,抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂)的剂量取决于许多因素,包括但不限于受影响的组织类型、正在治疗的自身免疫性疾病的类型、疾病的严重程度以及受试者的健康状况和对药剂治疗的反应。因此,药剂的剂量可根据每个受试者和施用模式而改变。在一些实施方案中,当所述CTLA-4共刺激阻滞剂未施用于所述受试者时,一定剂量的所述抗CD2抗体或其抗原结合片段不是治疗有效的。在一些实施方案中,当所述抗CD2抗体或其抗原结合片段未施用于所述受试者时,一定剂量的所述CTLA-4共刺激阻滞剂不是治疗有效的。在一些实施方案中,当所述CTLA-4共刺激阻滞剂也施用于所述受试者时,将较低剂量的所述抗CD2抗体或其抗原结合片段施用于所述受试者。在一些实施方案中,当所述抗CD2抗体或其抗原结合片段也施用于所述受试者时,将较低剂量的所述CTLA-4共刺激阻滞剂施用于所述受试者。在一些实施方案中,所述剂量低约或至少约2%、5%、7%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或低超过70%。在一些实施方案中,剂量低约或至少约2倍、5倍、7倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、80倍或低超过80倍。在一些实施方案中,剂量低约或至少约1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、12mg/kg、15mg/kg、17mg/kg、20mg/kg或低超过20mg/kg。在一些实施方案中,剂量低约或至少约5mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、75mg、100mg、150mg、175mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg或低超过500mg。

[0166] 可以用本文所述的方法治疗的免疫相关病症或疾病的实例包括但不限于全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、多关节幼年特发性关节炎(JIA)、骨关节炎、幼年慢性关节炎、脊柱关节病、系统性硬化症、特发性炎性肌病、舍格伦综合征、系统性血管炎、结节病、自身免疫性溶血性贫血、恶性贫血、自身免疫性血小板减少症、甲状腺炎、糖尿病、免疫介导的肾脏疾病、中枢或外周神经系统脱髓鞘疾病、特发性脱髓鞘性多发性神经病、格林-巴利综合征、莱姆病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、肝胆疾病、感染性或自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、古德帕斯丘综合征、肉芽肿性肝炎、硬化性胆管炎、炎症性肠病、谷蛋白敏感性肠病、惠普耳氏病、自身免疫性或免疫介导的皮肤病、大疱性皮肤病、多形性红斑、接触性皮炎、银屑病、过敏性疾病、哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎、食物过敏、荨麻疹、多发性硬化、葡萄膜炎、肺部免疫性疾病、嗜酸细胞性肺炎、特发性肺纤维化、过敏性肺炎、器官移植相关疾病、组织移植相关疾病、移植物排斥、移植物抗宿主病(GVHD)、德维克氏病、急性播散性脑脊髓炎、急性脱髓鞘性视神经炎、脱髓鞘性横向脊髓炎、米勒费雪综合征、脑脊髓神经根神经病、急性脱髓鞘性多神经病、肿胀性多发性硬化、巴洛

氏同心性硬化、斑秃、强直性脊柱炎、美尼尔氏病、抗磷脂综合征、混合性结缔组织病、自身免疫性艾迪生病、重症肌无力、自身免疫性肝炎、寻常型天疱疮、白塞氏病、大疱性类天疱疮、结节性多动脉炎、心肌病、多软骨炎、口炎性腹泻-皮炎、多腺体综合征、慢性疲劳综合征(cfids)、风湿性多肌痛、慢性炎症性脱髓鞘、多发性肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、查格-施特劳斯综合征、瘢痕性类天疱疮、crest综合征、雷诺现象、冷凝集素病、赖特综合征、克罗恩病、风湿热、盘状狼疮、特发性混合性冷凝球蛋白血症、纤维肌痛、硬皮病、格雷夫氏病、舍格伦综合征、僵人综合征、桥本氏甲状腺炎、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、溃疡性结肠炎、局灶性节段性肾小球硬化、IgA肾病、胰岛素依赖型糖尿病(I型)、扁平苔藓和白癜风。

[0167] 在一些实施方案中,免疫相关病症或疾病是类风湿性关节炎、多关节幼年特发性关节炎(JIA)和/或银屑病关节炎。在一些实施方案中,免疫相关病症或疾病是类风湿性关节炎。在一些实施方案中,免疫相关病症或疾病是与器官移植相关的病症或疾病和/或与组织移植相关的病症或疾病。在一些实施方案中,免疫相关病症或疾病是与人体任何器官和/或与组织移植相关的病症或疾病。在一些实施方案中,免疫相关病症或疾病是与肺、肾脏、胰腺、心脏、肝脏、皮肤、胃、肠、胃肠道移植和/或来自其中的组织移植相关的病症或疾病。在一些实施方案中,免疫相关病症或疾病是与肝脏移植和/或肝脏组织移植相关的病症或疾病。

[0168] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括向已接受来自供体的器官和/或组织移植的受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂。如本文所用,供体是从其取得要移植的器官(例如,肝脏或肾脏)的个体。供体可以与受者属于同一物种并且供体可以是活着的或已故的。供体可以与受者相关或者可以与受者无关。如本文所用,受者是将会接受移植器官(例如,肝脏或肾脏)和/或组织的受试者。受者可以与供体相关或无关。受者可以与供体HLA匹配或HLA不匹配。

[0169] 在一些实施方案中,移植器官(例如,肝或肾)可以是整个器官、器官的一部分、源自器官的组织或细胞。在一些实施方案中,移植整个器官(例如,肝脏或肾脏)。在一些实施方案中,移植部分器官(例如,肝脏或肾脏)。

[0170] 在一些实施方案中,本文所述的方法包括向已进行脾切除术的受试者(例如,在接受器官移植之前向已接受脾切除术的受试者)施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂。

[0171] 获得和植入器官(例如,肝脏或肾脏)的手术是技术人员熟知的。用于从供体手术移除和在受者中手术植入的任何手术都可以与本文提供的方法一起使用。在某些实施方案中,器官(例如,肝脏或肾脏)可以在移除和植入间期进行处理。

[0172] 在某些实施方案中,所述患者治疗持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20年或超过20年的时间段。

[0173] 在一些实施方案中,本文所述的方法导致细胞增殖减少。在一些实施方案中,本文所述的方法导致在向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂后从受试者获得的生物样品中的细胞数目降低。在一些实施方案中,在抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于受试者之后的细胞数目降低与向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段之前,向受试者施用CTLA-4共刺激阻滞剂之前,或在两种情况之

前从受试者获得的生物样品中的细胞数目降低相比更多。在一些实施方案中,在抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于受试者之后的细胞数目降低与用于治疗同等受试者中的免疫相关病症的同等方法中的细胞数目降低相比更高,所述同等方法不包括施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者。在一些实施方案中,同等受试者已被诊断患有或怀疑患有与受试者相同的免疫相关病症。在一些实施方案中,同等受试者具有至少一种与受试者共同的症状。在一些实施方案中,所述降低多约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、100%或超过100%。在一些实施方案中,在抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于受试者之后从受试者获得的生物样品中的细胞数目与在抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于受试者之前,或抗CD2抗体或其抗原结合片段或CTLA-4共刺激阻滞剂中的一者而非两者施用于受试者之后从受试者获得的生物样品中的细胞数目相比,低约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或超过100%。

[0174] 在一些实施方案中,本文所述的方法导致CD2水平降低。在一些实施方案中,本文所述的方法导致在向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂后从受试者获得的生物样品中的CD2水平降低。在一些实施方案中,在抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于受试者之后的CD2水平降低与向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段之前,向受试者施用CTLA-4共刺激阻滞剂之前,或在两种情况之前从受试者获得的生物样品中的CD2水平降低相比更多。在一些实施方案中,在抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于受试者之后的CD2水平降低与用于治疗同等受试者中的免疫相关病症的同等方法中的CD2水平降低相比更高,所述同等方法不包括施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者。在一些实施方案中,同等受试者已被诊断患有或怀疑患有与受试者相同的免疫相关病症。在一些实施方案中,同等受试者具有至少一种与受试者共同的症状。在一些实施方案中,所述降低多约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、100%或超过100%。在一些实施方案中,在抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于受试者之后从受试者获得的生物样品中的CD2水平与在抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于受试者之前,或抗CD2抗体或其抗原结合片段或CTLA-4共刺激阻滞剂中的一者而非两者施用于受试者之后从受试者获得的生物样品中的CD2水平相比,低约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或超过100%。

[0175] 在一些实施方案中,本文所述的方法产生协同作用。在一些实施方案中,本文所述的方法在向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者后在受试者中产生协同作用。在一些实施方案中,向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂与向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段或CTLA-4共刺激阻滞剂中的一者而非两者相比是协同的。在一些实施方案中,本文所述的方法引起同种免疫应答降低。在一些实施方案中,本文所述的方法在向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和

CTLA-4共刺激阻滞剂两者后在受试者中引起同种免疫应答降低。在一些实施方案中,在抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于受试者之后的同种免疫应答降低与向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段之前,向受试者施用CTLA-4共刺激阻滞剂之前,或在两种情况之前受试者中的同种免疫应答降低相比更多。在一些实施方案中,在抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于受试者之后的同种免疫应答降低与用于治疗同等受试者中的免疫相关病症的同等方法中的同种免疫应答降低相比更多,所述同等方法不包括向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者。在一些实施方案中,同等受试者已被诊断患有或怀疑患有与受试者相同的免疫相关病症。在一些实施方案中,同等受试者具有至少一种与受试者共同的症状。在一些实施方案中,所述降低多约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、100%或超过100%。在一些实施方案中,在抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于受试者之后受试者中的同种免疫应答与在抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂两者都施用于受试者之前,或抗CD2抗体或其抗原结合片段或CTLA-4共刺激阻滞剂中的一者而非两者施用于受试者之后受试者中的同种免疫应答相比,低约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或超过100%。

[0176] 5.3.1 炎性免疫病症患者的治疗及适合治疗的受试者

[0177] 本文描述了用于治疗患有免疫系统的慢性或急性炎性病症的人类受试者的方法。本文描述了用于治疗患有免疫相关病症或疾病的人类受试者的方法。本文描述了用于预防受试者的免疫相关病症或疾病的方法。患有炎性免疫病症的个体可以遵循本文描述的方法以治疗所述病症的症状为目标。在某些实施方案中,免疫系统的急性或慢性病症可以是但不限于移植物抗宿主病(GVHD)、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、1型糖尿病、银屑病、溃疡性结肠炎、炎症性肠病(克罗恩氏病)、乳糜泻、舍格伦氏病、狼疮、多发性硬化、局灶性节段性肾小球硬化、特应性皮炎、肌萎缩性侧索硬化、原发性胆汁性肝硬化以及原发性硬化性胆管炎和严重哮喘。在某些实施方案中,西利珠单抗的耗竭型式可以用于治疗自身免疫性疾病。在一些实施方案中,耗竭性CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与CTLA-4共刺激阻滞剂组合使用和/或与如本文所述的另一种药剂组合使用(例如,用于治疗患有慢性病状诸如免疫系统的慢性或急性炎性病症的受试者;或用于治疗患有CD8+T细胞驱动病状的受试者)。在一些实施方案中,非耗竭性CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与CTLA-4共刺激阻滞剂组合使用和/或与如本文所述的另一种药剂组合使用(例如,用于治疗患有慢性病状诸如免疫系统的慢性或急性炎性病症的受试者;或用于治疗患有CD8+T细胞驱动病状的受试者)。

[0178] 术语“受试者”、“受者”和“患者”在本文中可互换使用。在一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,受试者或有需要的受试者是患有或预计患有或发展免疫相关病症或疾病的受试者。在一些实施方案中,受试者或有需要的受试者是已经或将要接受移植手术的受试者。在一些实施方案中,受试者或有需要的受试者是患有免疫系统的慢性或急性炎性病症的受试者。在一些实施方案中,受试者是灵长类动物。在某些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者是成人。在一些实施方案中,受试者是儿童。在

一些实施方案中,受试者是儿科患者。在一些实施方案中,受试者是青少年。在一些实施方案中,受试者至少5岁、10岁、15岁、18岁、21岁、50岁、60岁、65岁、70岁或超过70岁。在一些实施方案中,受试者至多5岁、10岁、15岁、18岁或21岁。在一些实施方案中,受试者尚未接受过针对免疫相关病症或疾病的先前治疗。在一些实施方案中,在向受试者施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂之前,受试者在过去1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、9个月、1年、2年或超过2年中尚未接受过针对免疫相关病症或疾病的先前治疗。在一些实施方案中,受试者是首次治疗的受试者。在一些实施方案中,受试者未接受过针对免疫相关病症或疾病的治疗。在一些实施方案中,受试者未接受过甲氨蝶呤。在一些实施方案中,受试者尚未接受过抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂的先前治疗。在一些实施方案中,受试者对于针对免疫相关病症或疾病的治疗有抗性。在一些实施方案中,受试者正在接受或已经接受针对免疫相关病症或疾病的治疗,所述治疗不是抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂。

[0179] 在一些实施方案中,被诊断患有免疫相关疾病或病症、倾向于或可能发展免疫相关疾病或病症或正在经历至少一种与免疫相关疾病或病症相关的症状的受试者可以适合用本文提供的方法治疗。在一些实施方案中,受试者被诊断患有至少一种、至少两种、至少三种或多于至少三种免疫相关疾病或病症。可以用本公开的方法治疗或预防的免疫相关疾病或病症的非限制性实例提供在节错误!未找到引用源。

[0180] 已经接受或将要接受器官和/或组织移植的受试者可以适合用本文提供的方法治疗。本文所述的方法可用于已经接受或将要接受任何器官和/或组织移植(例如,肺、心脏、肾脏、肝脏、胃、肠、胰腺、皮肤或脾脏)的受试者。其器官已经因包括损伤、疾病或先天缺陷在内的方式而受损的个体可能符合接受器官(例如,肝脏或肾脏)移植的标准,并且可以根据本文所述的方法进行治疗。根据本文所述的方法治疗的受者可能出于任何原因需要器官移植。一般来说,患有终末期器官疾病,其预期寿命预计通过器官移植会延长超过未进行器官移植情况下的预期寿命的患者,可以考虑进行器官移植。

[0181] 在具体实施方案中,根据本文所述的方法治疗的受者已经接受了遗传疾病所必需的器官移植。在具体实施方案中,器官移植是活的体供体器官移植。在具体实施方案中,器官移植是已故体供体器官移植。在一些实施方案中,器官移植可以是ABO相容性移植。在一些实施方案中,器官移植可以是ABO不相容性移植。在一些实施方案中,根据本文所述的方法治疗的受者可具有小于30、小于20或小于10的终末期肝病模型(MELD)评分。在一些实施方案中,根据本文所述的方法治疗的受者可以是爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)血清阳性的。在一些实施方案中,受者在接受移植之前已经进行了脾切除术。在一些实施方案中,受者在接受移植之前尚未进行脾切除术。在一些实施方案中,受试者需要或者已经接受了肝脏移植。例如,在EASL Clinical Practice Guidelines:Liver transplantation(J Hepatol.2016年2月;64(2):433-485.doi:10.1016/j.jhep.2015.10.006)中描述了肝移植适应症的实例。

[0182] 5.3.2用于患者(例如,患有炎性免疫病症的患者)的剂量和方案

[0183] 在某些实施方案中,治疗患有免疫系统的慢性或急性炎性病症的人类受试者的方法包括向受试者施用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)或包含本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的药物组合物作为长期治疗方案

的组分。在某些实施方案中,治疗患有免疫相关病症或疾病的人类受试者的方法包括向受试者施用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)或包含本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的药物组合物。在某些实施方案中,所述方法包括预防受试者的免疫相关病症或疾病。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以1000mg、1100mg、1200mg、1300mg、1400mg、1500mg、1600mg、1700mg、1800mg、1900mg、2000mg、2100mg、2200mg、2300mg、2400mg、2500mg、2600mg、2700mg、2800mg、2900mg、3000mg、3100mg、3200mg、3300mg、3400mg、3500mg、3600mg、3700mg、3800mg、3900mg、4000mg、4100mg、4200mg、4300mg、4400mg、4500mg、4600mg、4700mg、4800mg、4900mg、5000mg、1000mg至1600mg、1500mg至2100mg、2000mg至2600mg、2500mg至3100mg、3000mg至3600mg、3500mg至4100mg、4000mg至4600mg或4500mg至5000mg的量施用。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以2400mg的量施用。

[0184] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以0.01mg/kg/剂、0.02mg/kg/剂、0.03mg/kg/剂、0.04mg/kg/剂、0.05mg/kg/剂、0.1mg/kg/剂、0.15mg/kg/剂、0.2mg/kg/剂、0.25mg/kg/剂、0.3mg/kg/剂、0.35mg/kg/剂、0.4mg/kg/剂、0.45mg/kg/剂、0.5mg/kg/剂、0.55mg/kg/剂、0.6mg/kg/剂、0.65mg/kg/剂、0.7mg/kg/剂、0.75mg/kg/剂、0.8mg/kg/剂、0.85mg/kg/剂、0.9mg/kg/剂、0.95mg/kg/剂、1.0mg/kg/剂、2.0mg/kg/剂、3.0mg/kg/剂、4.0mg/kg/剂、5.0mg/kg/剂、6.0mg/kg/剂、7.0mg/kg/剂、8.0mg/kg/剂、9.0mg/kg/剂、10mg/kg/剂、11mg/kg/剂、12mg/kg/剂、13mg/kg/剂、14mg/kg/剂、15mg/kg/剂、16mg/kg/剂、17mg/kg/剂、18mg/kg/剂、19mg/kg/剂、20mg/kg/剂、21mg/kg/剂、22mg/kg/剂、23mg/kg/剂、24mg/kg/剂、25mg/kg/剂、26mg/kg/剂、27mg/kg/剂、28mg/kg/剂、29mg/kg/剂、30mg/kg/剂、31mg/kg/剂、32mg/kg/剂、33mg/kg/剂、34mg/kg/剂、35mg/kg/剂、36mg/kg/剂、37mg/kg/剂、38mg/kg/剂、39mg/kg/剂、40mg/kg/剂、41mg/kg/剂、42mg/kg/剂、43mg/kg/剂、44mg/kg/剂、45mg/kg/剂、46mg/kg/剂、47mg/kg/剂、48mg/kg/剂、49mg/kg/剂、50mg/kg/剂的剂量施用。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以0.1-0.3mg/kg/剂、0.2-0.4mg/kg/剂、0.3-0.5mg/kg/剂、0.4-0.6mg/kg/剂、0.45-0.65mg/kg/剂、0.5-0.7mg/kg/剂、0.55-0.75mg/kg/剂、0.6-0.8mg/kg/剂、0.65-0.85mg/kg/剂、0.7-0.9mg/kg/剂、0.8-1.0mg/kg/剂、1.0mg/kg/剂至6.0mg/kg/剂、5.0mg/kg/剂至10mg/kg/剂、9.0mg/kg/剂至15mg/kg/剂、14mg/kg/剂至20mg/kg/剂、19mg/kg/剂至25mg/kg/剂、24mg/kg/剂至30mg/kg/剂、29mg/kg/剂至35mg/kg/剂、34mg/kg/剂至40mg/kg/剂、39mg/kg/剂至45mg/kg/剂或44mg/kg/剂至50mg/kg/剂的剂量范围施用。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以0.1mg/kg/剂的剂量施用。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以0.6mg/kg/剂的剂量施用。

[0185] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可

以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以2mg/kg/剂的剂量施用6周,然后在此后每4周施用一次;施用5周,然后在此后每4周施用一次;施用4周,然后在此后每4周施用一次;施用3周,然后在此后每4周施用一次;或者施用2周,然后在此后每4周施用一次。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以2mg/kg/剂的剂量施用4周,然后在此后每4周施用一次。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以2.5mg/kg/剂的剂量施用6周,然后在此后每4周施用一次;施用5周,然后在此后每4周施用一次;施用4周,然后在此后每4周施用一次;施用3周,然后在此后每4周施用一次;或者施用2周,然后在此后每4周施用一次。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以2.5mg/kg/剂的剂量施用4周,然后在此后每4周施用一次。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以3mg/kg/剂的剂量施用6周,然后在此后每4周施用一次;施用5周,然后在此后每4周施用一次;施用4周,然后在此后每4周施用一次;施用3周,然后在此后每4周施用一次;或者施用2周,然后在此后每4周施用一次。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以3mg/kg/剂的剂量施用4周,然后在此后每4周施用一次。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以3.5mg/kg/剂的剂量施用6周,然后在此后每4周施用一次;施用5周,然后在此后每4周施用一次;施用4周,然后在此后每4周施用一次;施用3周,然后在此后每4周施用一次;或者施用2周,然后在此后每4周施用一次。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以3.5mg/kg/剂的剂量施用4周,然后在此后每4周施用一次。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以3.75mg/kg/剂的剂量施用6周,然后在此后每4周施用一次;施用5周,然后在此后每4周施用一次;施用4周,然后在此后每4周施用一次;施用3周,然后在此后每4周施用一次;或者施用2周,然后在此后每4周施用一次。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以3.75mg/kg/剂的剂量施用4周,然后在此后每4周施用一次。

[0186] 在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以本领域已知的便利方式施用于受试者,所述方法包括皮下、静脉内、血管内、局部、动脉内、颅内、肌肉内、口服、眶内、通过吸入、透皮、腹膜内或通过允许受者中的T细胞耗竭的施用途径。在一个具体实施方案中,抗CD2抗体或其抗原结合片段,或CD2结合分子是静脉内施用的。

[0187] 在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是人源化单克隆抗体。在一个具体实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是西利珠单抗(MEDI-507)。在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的施用可以如本文所述进行修改。在一些实施方案中,在施用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗

原结合片段)之前给予甲基强的松龙。在一些实施方案中,对乙酰氨基酚(例如,1000mg)和/或抗组胺药(例如,25mg的H1-拮抗剂诸如苯海拉明)在施用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)之前施用。

[0188] 不受理论的束缚,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)以足以增加受者中调控性T细胞水平的剂量施用。具体地,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)以一定剂量施用,使得受者中的FOXP3+调控性T细胞水平相对于未用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)处理时的FOXP3+调控性T细胞增加,例如增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%或至少250%。

[0189] 本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以作为治疗方案的组分向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者施用。在某些实施方案中,在治疗方案中使用的本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)是治疗方案的唯一组分。在一个具体实施方案中,在治疗方案中向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者施用的本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与和西利珠单抗相同的表位结合。

[0190] 在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以足够高以诱导缓解的剂量(负荷剂量)施用,接着是较低频率的给药,诸如但不限于每月一次、每两个月一次或每三个月一次。

[0191] 在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以每周一次的间隔施用。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以每两周一次的间隔施用。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以每天一次的间隔施用,直至诱导疾病缓解或疾病静止,然后在此后每周施用一次。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以每周一次的间隔施用12次,接着每两周施用一次。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以每两周一次的间隔施用,然后每月施用一次。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以每半月一次的间隔施用。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向患有慢性或急性炎性免疫病症的患者以每三个月一次的间隔施用。

[0192] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以施用于有需要的受试者或患有慢性或急性炎性免疫病症的患者,其中所述患者正在治疗,持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24年或至少25年的时间段。在某些实施方案中,有需要的受试者或患有慢性或急性炎性免疫病症的患者可以用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)或包含本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片

段)的药物组合物治疗,持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24年或至少25年的时间段。

[0193] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以配制用于皮下、静脉内、血管内、局部、关节内、动脉内、颅内、肌肉内、口服、眶内、玻璃体内、吸入、腹膜内、骨内、气管内、舌下、口腔、直肠、皮内、鞘内、髓内或透皮施用途径。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)配制用于静脉内施用于患有慢性或急性炎性免疫病症的患者。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以配制用于皮下施用于有需要的受试者或患有慢性或急性炎性免疫病症的患者。

[0194] 在某些实施方案中,可以向有需要的受试者或患有免疫系统的慢性或急性炎性病症的患者施用包含治疗有效量的本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或抗原结合片段)的药物组合物。在某些实施方案中,包含治疗有效量的本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的药物组合物容纳在用于向有需要的受试者或患有免疫系统的慢性或急性炎性病症的患者的试剂盒或系统中。在某些实施方案中,试剂盒将包含容纳在一个或多个容器中的药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。容纳所述药物组合物可以包装在其中的容器可以包括但不限于瓶、包、安瓿、管、吸入器、袋、小瓶和容器中。在某些实施方案中,试剂盒包含进行药物施用的说明。在某些实施方案中,试剂盒包含可用于施用药物组合物的装置,包括但不限于注射器、无针注入器、滴袋、灌注泵、泵、贴片和吸入器。

[0195] 在某些实施方案中,受试者或患有慢性或急性炎性病症的患者的患病器官可以灌注如本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。在一个更具体的实施方案中,使用灌注泵为患病器官灌注CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。在某些实施方案中,要灌注到患病器官中的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的浓度为至少0.001mg/升、至少0.005mg/升、至少0.01mg/升、至少0.05mg/升、至少0.1mg/升、至少0.5mg/升、至少1.0mg/升、至少5.0mg/升、至少10mg/升或至少50mg/升。

[0196] 5.3.3用免疫抑制剂对炎性免疫病症患者的组合疗法

[0197] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与低剂量的免疫抑制剂作为长期患者疗法的组分同时施用。不受理论的束缚,可以与本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的施用组合的免疫抑制剂包括但不限于他克莫司(tacrolimus)、环孢菌素、贝拉西普、抗CD40抗体、抗OX40L抗体、抗CD28抗体、抗CD27抗体、抗CD154抗体、抗ICOS抗体、抗或激动性4-1BB(CD137)抗体、BCL-2抑制剂、吗替麦考酚酯、麦考酚酸衍生物诸如Myfortic(肠溶包衣霉酚酸钠)、西罗莫司(sirolimus)、依维莫司(everolimus)、抗胸腺细胞球蛋白、巴利昔单抗(basiliximab)、强的松、环磷酰胺、氟达拉滨(fludarabine)和利妥昔单抗(rituximab)(Adams等人,J Immunol,2016,197(6)2045-2050;Kinnear等人,Transplantation.2013年2月27日;95(4):527-535;Zhang和Vignali,Immunity.2016年5月17日;44(5):1034-51)。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可作为双重共刺激阻滞剂的一部分施用。在一个具体实施方案中,当免疫抑制剂与本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)同时施用时,治疗有效所需的免疫抑制剂剂量较低。在某些实施方案中,CD2结合分子

(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以与一种免疫抑制剂同时施用。在其他实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以与一种以上的免疫抑制剂同时施用。

[0198] CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)和免疫抑制剂的组合疗法可用于治疗患有免疫系统的慢性或急性炎症性病症的患者。此类病症可包括但不限于类风湿性关节炎、幼年特发性关节炎、银屑病关节炎、自身免疫性肝病、川崎病(Kawasaki disease)、炎症性肠病、强直性脊柱炎、银屑病、溃疡性结肠炎、交感性眼炎、年龄相关性黄斑变性、非传染性后葡萄膜炎、Vogt-Koyanagi-Haranda病、结节病、1型糖尿病、克罗恩病、乳糜泻、狼疮、舍格伦综合征、特应性皮炎、多发性硬化、移植物抗宿主病(GVHD)和局灶性节段性肾小球硬化。

[0199] 5.3.4器官移植患者群体

[0200] 有一个器官或多于一个器官已经因包括损伤、疾病或先天缺陷在内的方式而受损的个体,可能符合接受器官移植的标准。已被选择接受器官移植的个体可以遵循本文所述的这些方法,以诱导混合嵌合状态为目标,其中受者和供体造血细胞在受者中共存。当达到混合嵌合状态时,它减少了对长期免疫抑制疗法的需要。

[0201] 在一些实施方案中,受者可以具有高度致敏的免疫系统。高度致敏的免疫系统的发展是由先前暴露于外来组织和针对那些组织的抗体的发展引起的。这种暴露的原因可包括输血、先前的移植或妊娠。在致敏状态下,免疫系统高度警惕并产生会攻击移植的器官的抗体。在某些实施方案中,如本文所述的受者可具有致敏或未致敏的免疫系统。在此类受者中,IdeS可以与利妥昔单抗一起施用。IdeS是一种切割IgG重链的酶,抑制抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。在某些实施方案中,IdeS与利妥昔单抗组合施用。在某些实施方案中,其他脱敏方案可单独使用或与利妥昔单抗、IdeS或其他脱敏方案组合使用。这些可以包括但不限于静脉内免疫球蛋白、血浆去除术、免疫吸附、双重过滤、蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米(Bortezomib))和补体抑制剂。

[0202] 5.3.5器官移植治疗

[0203] 在某些实施方案中,所述方法可以包括将如本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)直接输注至待移植的器官中。可以利用本文提供的方法移植的器官可以是任何实体器官。在一些实施方案中,器官可以是肾脏、心脏、肠、肝脏、肺、胰腺或者可以使用本文提供的方法移植的其他器官。在一些实施方案中,器官可以是血管复合同种异体移植物,包括可以使用本文提供的方法移植的手、脚、其他肢体、面部或其他身体部位。在一些实施方案中,移植器官可以是整个器官、器官的一部分或源自器官的细胞。

[0204] 在某些实施方案中,移植器官可以直接注射本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。这种注射可以在待移植器官的一个部位施用或者可以在待移植器官的多个部位施用。在某些实施方案中,待移植器官可以在含有本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的浴中孵育。这种孵育可以发生在运输到手术室的过程中或发生在手术地点。这种孵育将持续足够时间以允许将本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)摄取到待移植器官中。这种孵育可以进行15分钟、30分钟、45分钟、1小时、1.25小时、1.5小时、1.75小时、2小时、2.25小时、2.5小时、2.75小时、3小时、3.25小时、3.5小时、3.75小时、4小时、4.25小时、4.5小时、4.75小时、5小时、5.25小时、5.5小时、5.75小时、6小时、6.5小时、7小时、7.5小时、8小时、8.5小时、9小时、9.5小时、10小时、10.5

小时、11小时、11.5小时、12小时、12.5小时、13小时、13.5小时、14小时、14.5小时、15小时、15.5小时、16小时、16.5小时、17小时、17.5小时、18小时、18.5小时、19小时、19.5小时、20小时、20.5小时、21小时、21.5小时、22小时、22.5小时、23小时、23.5小时或24小时。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)用于注射的剂量为至少0.01mg/kg、至少0.05mg/kg、至少0.1mg/kg、至少0.5mg/kg、至少1mg/kg、至少5mg/kg、至少10mg/kg或至少50mg/kg。

[0205] 在某些实施方案中,待移植器官在包含本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的浴中孵育。在更具体的实施方案中,从器官从供体取出时直至植入受者中,器官保持在包含本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的浴中。在某些实施方案中,器官浴中本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的浓度为至少0.01mg/升、至少0.05mg/升、至少0.1mg/升、至少0.5mg/升、至少1mg/升、至少5mg/升、至少10mg/升或至少50mg/升。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可通过循环系统的方式施用于待移植器官。具体地,可以将导管插入相邻血管中并附接到泵上。本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以泵送通过血管并递送至器官。

[0206] 在某些实施方案中,待移植器官可以灌注如本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。在一个更具体的实施方案中,使用灌注泵为移植器官灌注CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。在某些实施方案中,要灌注到器官中的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的浓度为至少0.001mg/升、至少0.005mg/升、至少0.01mg/升、至少0.05mg/升、至少0.1mg/升、至少0.5mg/升、至少1.0mg/升、至少5.0mg/升、至少10mg/升或至少50mg/升。

[0207] 5.3.6剂量和方案(例如,对于器官移植接受者而言)

[0208] 在某些实施方案中,本文提供了一种治疗或预防有需要的受试者的免疫相关病症或疾病的方法,该方法是通过单独或与一种或多种其他药剂(例如,CTLA-4共刺激阻滞剂)组合施用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)或包含如本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的药物组合物。在某些实施方案中,治疗接受器官移植手术的人类受试者的方法包括在移植之前向受试者施用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)或包含如本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的药物组合物作为预处理方案的组分。在某些实施方案中,施用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的目的是在移植接受者中产生耐受性,如通过例如Massart,A等人(Clin Exp Immunol.2017;189(2):138-157)和Newell KA,Turka LA.(Curr Opin Organ Transplant.2015;20(4):400-405)在综述中概述的测定所确定的。这些测定可以包括但不限于确定T细胞反应性和B细胞致敏的抗原特异性测定和鉴定耐受性生物标志物的测定。在某些实施方案中,本文提供的治疗方法包括在受试者被诊断患有免疫相关病症或疾病之前向受试者施用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。在某些实施方案中,本文提供的治疗方法包括在受试者被诊断患有免疫相关病症或疾病之后向受试者施用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。在某些实施方案中,本文提供的治疗方法包括在移植前向移植接受者施用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。在一些实施方案中,可以在移植前1天、移植前2天、移植前3天、移植前4天、移植前5天、

移植前6天、移植前7天、移植前1天和2天、移植前2天和3天、移植前3天和4天、移植前1天及移植前2天和3天,或移植前1天和移植前2天及移植前3天和移植前4天向受者施用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在移植前1天和移植前2天施用于受者。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可在移植前1天和移植前6天施用于受者。在某些实施方案中,可以施用测试剂量的本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。在某些实施方案中,测试剂量的施用是任选的。在特定实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)在移植手术当天施用。在某些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向受试者以足够高以诱导缓解的剂量(负荷剂量)施用,接着是较低频率的给药,诸如但不限于每月一次、每两个月一次或每三个月一次。

[0209] 在一些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在移植前1周、移植前2周、移植前3周或移植前4周每天施用于受者。在一些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在移植前1周、移植前2周、移植前3周或移植前4周向受者每周施用两次。在一些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在移植前1周、移植前2周、移植前3周或移植前4周向受者每周施用三次。在一些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在移植前1周、移植前2周、移植前3周或移植前4周向受者每周施用四次。在一些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在移植前1周、移植前2周、移植前3周或移植前4周向受者每周施用五次。在一些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在移植前1周、移植前2周、移植前3周或移植前4周向受者每周施用六次。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在移植当天施用。

[0210] 在一个具体实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向受试者以每周一次的间隔施用。在一个具体实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向受试者以每两周一次的间隔施用。在一个具体实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向受试者每天施用,直至诱导疾病缓解或疾病静止,然后在此后每周施用一次。在一个具体实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向受试者以每周一次的间隔施用12周,接着每两周施用一次。在一个具体实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向受试者以每两周一次的间隔施用,然后每月施用一次。在一个具体实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向受试者以每半月一次的间隔施用。在一个具体实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向受试者以每三月一次的间隔施用。

[0211] 在一些实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)向受试者以施用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的每天、每剂、每周、每两周或每月100mg、250mg、500mg、700mg、1000mg、1100mg、1200mg、1300mg、1400mg、1500mg、1600mg、1700mg、1800mg、1900mg、2000mg、2100mg、2200mg、2300mg、2400mg、2500mg、2600mg、2700mg、2800mg、2900mg、3000mg、3100mg、3200mg、3300mg、3400mg、3500mg、3600mg、3700mg、3800mg、3900mg、4000mg、4100mg、4200mg、4300mg、4400mg、4500mg、4600mg、4700mg、4800mg、4900mg、5000mg、

1000mg至1600mg、1500mg至2100mg、2000mg至2600mg、2500mg至3100mg、3000mg至3600mg、3500mg至4100mg、4000mg至4600mg或4500mg至5000mg的量施用。

[0212] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向受试者或向移植接受者以约或至少约0.01mg/kg/剂、0.02mg/kg/剂、0.03mg/kg/剂、0.04mg/kg/剂、0.05mg/kg/剂、0.1mg/kg/剂、0.15mg/kg/剂、0.2mg/kg/剂、0.25mg/kg/剂、0.3mg/kg/剂、0.35mg/kg/剂、0.4mg/kg/剂、0.45mg/kg/剂、0.5mg/kg/剂、0.55mg/kg/剂、0.6mg/kg/剂、0.65mg/kg/剂、0.7mg/kg/剂、0.75mg/kg/剂、0.8mg/kg/剂、0.85mg/kg/剂、0.9mg/kg/剂、0.95mg/kg/剂、1.0mg/kg/剂、2.0mg/kg/剂、3.0mg/kg/剂、4.0mg/kg/剂、5.0mg/kg/剂、6.0mg/kg/剂、7.0mg/kg/剂、8.0mg/kg/剂、9.0mg/kg/剂、10mg/kg/剂、11mg/kg/剂、12mg/kg/剂、13mg/kg/剂、14mg/kg/剂、15mg/kg/剂、16mg/kg/剂、17mg/kg/剂、18mg/kg/剂、19mg/kg/剂、20mg/kg/剂、21mg/kg/剂、22mg/kg/剂、23mg/kg/剂、24mg/kg/剂、25mg/kg/剂、26mg/kg/剂、27mg/kg/剂、28mg/kg/剂、29mg/kg/剂、30mg/kg/剂、31mg/kg/剂、32mg/kg/剂、33mg/kg/剂、34mg/kg/剂、35mg/kg/剂、36mg/kg/剂、37mg/kg/剂、38mg/kg/剂、39mg/kg/剂、40mg/kg/剂、41mg/kg/剂、42mg/kg/剂、43mg/kg/剂、44mg/kg/剂、45mg/kg/剂、46mg/kg/剂、47mg/kg/剂、48mg/kg/剂、49mg/kg/剂或50mg/kg/剂的剂量施用。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向受试者或向移植接受者以约0.1至约0.3mg/kg/剂、约0.2至约0.4mg/kg/剂、约0.3至约0.5mg/kg/剂、约0.4至约0.6mg/kg/剂、约0.45至约0.65mg/kg/剂、约0.5至约0.7mg/kg/剂、约0.55至约0.75mg/kg/剂、约0.6至约0.8mg/kg/剂、约0.65至约0.85mg/kg/剂、约0.7至约0.9mg/kg/剂、约0.8至约1.0mg/kg/剂、约1至约1.5mg/kg/剂、约1.5至约2mg/kg/剂、约2至约2.5mg/kg/剂、约2.5至约3mg/kg/剂、约3至约3.5mg/kg/剂、约3.5至约4mg/kg/剂、约4至约4.5mg/kg/剂、约4.5至约5mg/kg/剂、约1.0mg/kg/剂至约6.0mg/kg/剂、约5.0mg/kg/剂至约10mg/kg/剂、约9.0mg/kg/剂至约15mg/kg/剂、约14mg/kg/剂至约20mg/kg/剂、约19mg/kg/剂至约25mg/kg/剂、约24mg/kg/剂至约30mg/kg/剂、约29mg/kg/剂至约35mg/kg/剂、约34mg/kg/剂至约40mg/kg/剂、约39mg/kg/剂至约45mg/kg/剂或约44mg/kg/剂至约50mg/kg/剂的剂量范围施用。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向受试者或向移植接受者以0.1mg/kg/剂的剂量施用。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向受试者或向移植接受者以0.6mg/kg/剂的剂量施用。

[0213] 在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在移植当天向有需要的受试者或向移植接受者以(或约)10mg/kg的剂量施用,接着在第2、6、14、28、42、56天以(或约)10mg/kg的剂量施用,然后在此后每28天施用一次。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在移植当天向有需要的受试者或向移植接受者以(或约)30mg/kg的负荷剂量施用,接着在第5天以(或约)15mg/kg的剂量施用,并且在此后每14天以(或约)7.5mg/kg的剂量施用一次。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在移植当天向有需要的受试者或向移植接受者以(约)30mg/kg的负荷剂量施用,接着在第5天以(或约)15mg/kg的剂量施用,并且在此后每14天以(或约)3.75mg/kg的剂量施用一次。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的

受试者或向移植接受者以(或约)30mg/kg的负荷剂量施用,接着在此后每14天以(或约)5.625mg/kg的剂量施用一次。

[0214] 不受理论的束缚,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)以足以增加受者中调控性T细胞水平的剂量施用。具体地,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以使受者中的FOXP3+调控性T细胞水平相对于未用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)处理时的FOXP3+调控性T细胞增加,例如增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%或至少250%。

[0215] 本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以作为术后治疗方案的组成部分向有需要的受试者或向移植接受者施用。在某些实施方案中,术后方案中使用的本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与预处理方案中施用的分子相同。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与预处理方案中施用的分子不同。在一个具体实施方案中,术后方案中施用的本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与和西利珠单抗相同的表位结合。

[0216] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在移植当天、移植后1天、移植后2天、移植后3天、移植后4天、移植当天和移植后1天、移植当天及移植后1天和移植后2天、移植当天及移植后1天和移植后2天和移植后3天、移植当天及移植后1天和移植后2天和移植后3天和移植后4天、移植当天及移植后1天和移植后2天和移植后3天和移植后4天和移植后5天、移植当天及移植后1天和移植后2天和移植后3天和移植后4天和移植后5天和移植后6天和移植后7天施用。在某些实施方案中,本文提供的治疗方法包括在移植后向有需要的受试者或向移植接受者施用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。在一些实施方案中,可以在移植后1天、移植后2天、移植后3天、移植后4天、移植后5天、移植后6天、移植后7天、移植后8天、移植后9天、移植后10天、移植后11天、移植后12天、移植后13天、移植后14天、移植后15天、移植后16天、移植后17天、移植后18天、移植后19天、移植后20天、移植后21天、移植后22天、移植后23天、移植后24天、移植后25天、移植后26天、移植后27天、移植后28天、移植后29天和/或移植后30天向受者施用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。在具体实施方案中,CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)在移植当天、移植后1天、移植后2天和/或移植后4天施用。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以每天、每两周或每月施用一次。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以通过输注或皮下施用来施用。在某个实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在移植手术后1周、移植手术后2周、移植手术后3周或移植手术后4周每天施用一次。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可在移植当天和移植后1天施用于受者。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可在移植当天及移植后1天和7天施用于受者。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可在移植当天及移植后1、8和13天施用于受者。

[0217] 在某些实施方案中,在术后方案中要施用于受者的本文所述的CD2结合分子(或抗

CD2抗体或其抗原结合片段)的剂量可以与在预处理方案中施用的剂量相同。在某些实施方案中,在术后方案中要施用于受者的本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的剂量可以与在预处理方案中施用的剂量不同。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向移植接受者以0.01mg/kg/剂、0.02mg/kg/剂、0.03mg/kg/剂、0.04mg/kg/剂、0.05mg/kg/剂、0.1mg/kg/剂、0.15mg/kg/剂、0.2mg/kg/剂、0.25mg/kg/剂、0.3mg/kg/剂、0.35mg/kg/剂、0.4mg/kg/剂、0.45mg/kg/剂、0.5mg/kg/剂、0.55mg/kg/剂、0.6mg/kg/剂、0.65mg/kg/剂、0.7mg/kg/剂、0.75mg/kg/剂、0.8mg/kg/剂、0.85mg/kg/剂、0.9mg/kg/剂、0.95mg/kg/剂、1.0mg/kg/剂、2.0mg/kg/剂、3.0mg/kg/剂、4.0mg/kg/剂、5.0mg/kg/剂、6.0mg/kg/剂、7.0mg/kg/剂、8.0mg/kg/剂、9.0mg/kg/剂、10mg/kg/剂、11mg/kg/剂、12mg/kg/剂、13mg/kg/剂、14mg/kg/剂、15mg/kg/剂、16mg/kg/剂、17mg/kg/剂、18mg/kg/剂、19mg/kg/剂、20mg/kg/剂、21mg/kg/剂、22mg/kg/剂、23mg/kg/剂、24mg/kg/剂、25mg/kg/剂、26mg/kg/剂、27mg/kg/剂、28mg/kg/剂、29mg/kg/剂、30mg/kg/剂、31mg/kg/剂、32mg/kg/剂、33mg/kg/剂、34mg/kg/剂、35mg/kg/剂、36mg/kg/剂、37mg/kg/剂、38mg/kg/剂、39mg/kg/剂、40mg/kg/剂、41mg/kg/剂、42mg/kg/剂、43mg/kg/剂、44mg/kg/剂、45mg/kg/剂、46mg/kg/剂、47mg/kg/剂、48mg/kg/剂、49mg/kg/剂或50mg/kg/剂的剂量施用。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向移植接受者以0.1至0.3mg/kg/剂、0.2至0.4mg/kg/剂、0.3至0.5mg/kg/剂、0.4至0.6mg/kg/剂、0.45至0.65mg/kg/剂、0.5至0.7mg/kg/剂、0.55至0.75mg/kg/剂、0.6至0.8mg/kg/剂、0.65至0.85mg/kg/剂、0.7至0.9mg/kg/剂、0.8至1.0mg/kg/剂、1.0mg/kg/剂至6.0mg/kg/剂、5.0mg/kg/剂至10mg/kg/剂、9.0mg/kg/剂至15mg/kg/剂、14mg/kg/剂至20mg/kg/剂、19mg/kg/剂至25mg/kg/剂、24mg/kg/剂至30mg/kg/剂、29mg/kg/剂至35mg/kg/剂、34mg/kg/剂至40mg/kg/剂、39mg/kg/剂至45mg/kg/剂或44mg/kg/剂至50mg/kg/剂的剂量范围施用。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以向有需要的受试者或向移植接受者以0.6mg/kg/剂的剂量施用。

[0218] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以在移植手术后施用于有需要的受试者或患者,其中所述患者正在治疗,持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24年或至少25年的时间段。在某些实施方案中,所述患者可以用本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)或包含本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的药物组合物治疗,持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24年或至少25年的时间段。

[0219] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以配制用于皮下、静脉内、血管内、局部、关节内、动脉内、颅内、肌肉内、口服、眶内、玻璃体内、吸入、腹膜内、骨内、气管内、舌下、口腔、直肠、皮内、鞘内、髓内或透皮施用途径。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)被配制用于静脉内施用于有需要的受试者或移植手术患者。在一个具体实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以配制用于皮下施用于有需要的受试者或移植手术患者。

[0220] 在某些实施方案中,可以向移植手术患者施用包含治疗有效量的本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的药物组合物。在某些实施方案中,包含治疗有效量的本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的药物组合物容纳在用于向移植手术患者施用的试剂盒或系统中。在某些实施方案中,试剂盒将包含容纳在一个或多个容器中的药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)。容纳所述药物组合物可以包装在其中的容器可以包括但不限于瓶、包、安瓿、管、吸入器、袋、小瓶和容器中。在某些实施方案中,试剂盒包含进行药物施用的说明。在某些实施方案中,试剂盒包含可用于施用药物组合物的装置,包括但不限于注射器、无针注入器、滴袋、泵、灌注泵、贴片和吸入器。

[0221] 5.3.7用免疫抑制剂对器官移植接受者的组合法

[0222] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)与低剂量的免疫抑制剂在器官移植手术后作为长期患者疗法的组分同时施用。不受理论的束缚,可以与本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)的施用组合的免疫抑制剂包括但不限于他克莫司(tacrolimus)、环孢菌素、贝拉西普、抗CD40抗体、抗OX40L抗体、抗CD28抗体、抗CD27抗体、抗CD154抗体、抗ICOS抗体、抗或激动性4-1BB(CD137)抗体、BCL-2抑制剂、吗替麦考酚酯、麦考酚酸衍生物诸如Myfortic(肠溶包衣霉酚酸钠)、西罗莫司(sirolimus)、依维莫司(everolimus)、抗胸腺细胞球蛋白、巴利昔单抗(basiliximab)、强的松、环磷酰胺、氟达拉滨(fludarabine)和利妥昔单抗(rituximab)(Adams等人,J Immunol,2016,197(6)2045-2050;Kinnear等人,Transplantation.2013年2月27日;95(4):527-535;Zhang和Vignali,Immunity.2016年5月17日;44(5):1034-51)。在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可作为双重共刺激阻滞剂的一部分施用。在一个具体实施方案中,当免疫抑制剂与本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)同时施用时,作为移植后治疗方案的一部分治疗有效所需的免疫抑制剂剂量较低。

[0223] 在某些实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以作为移植后治疗方案的一部分与一种免疫抑制剂同时施用。在其他实施方案中,本文所述的CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)可以作为移植后治疗方案的一部分与一种以上的免疫抑制剂同时施用。

[0224] 5.3.8CTLA-4共刺激阻滞剂

[0225] 在一些实施方案中,本文描述了通过向受试者施用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)和CTLA-4共刺激阻滞剂来治疗或预防受试者的免疫相关病症或疾病的方法。具体地,本文提供了使用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)和CTLA-4共刺激阻滞剂的组合治疗或预防免疫相关病症或疾病的方法,所述组合与使用单独或没有另一者的抗CD2抗体或其抗原结合片段或CTLA-4共刺激阻滞剂相比,产生协同作用。在一些实施方案中,治疗或预防免疫相关病症或疾病的方法还包括施用另一种药剂(例如,免疫抑制剂)。在某些实施方案中,施用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)和CTLA-4共刺激阻滞剂与向受试者仅施用抗CD2抗体或CTLA-4共刺激阻滞剂中的一种时相比,引起受试者中的同种免疫应答更多的降低。在某些实施方案中,施用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)和CTLA-4共刺激阻滞剂与向受试者仅施用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其

抗原结合片段)或CTLA-4共刺激阻滞剂中的一种时相比,引起CD2水平更多的降低。在某些实施方案中,向受试者施用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)和CTLA-4共刺激阻滞剂引起与仅向受试者施用CD2结合分子(或抗CD2抗体或其抗原结合片段)或CTLA-4共刺激阻滞剂中的一种之后获得的来自受试者的生物样品中的细胞数目相比,来自受试者的生物样品中的细胞数目更低。

[0226] 在某些实施方案中,本文所述的方法包括将抗CD2抗体或其抗原结合片段与CTLA-4共刺激阻滞剂组合施用于受试者。在一些实施方案中,CTLA-4共刺激阻滞剂是靶向CD80和/或CD86的CTLA4-Ig。在一些实施方案中,CTLA-4共刺激阻滞剂是具有增强的与B7-1和/或B7-2的结合的CTLA4-Ig变体。在一些实施方案中,CTLA-4共刺激阻滞剂是CTLA-4融合蛋白。在一些实施方案中,CTLA-4共刺激阻滞剂是CTLA-4Ig(例如,阿巴西普)。在一些实施方案中,CTLA-4共刺激阻滞剂是与Fc融合的CTLA-4胞外结构域。在一些实施方案中,与Fc融合的CTLA-4胞外结构域是贝拉西普(Nulojix®)。在一些实施方案中,与Fc融合的CTLA-4胞外结构域是阿巴西普(Orencia®)。在一些实施方案中,CTLA-4共刺激阻滞剂包括人CTLA4的A29Y/L104E变体型式。在一些实施方案中,CTLA-4共刺激阻滞剂在CTLA-4融合蛋白的CTLA4部分中包括至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或多于至少四个取代以增强对B7-1和B7-2的亲和力。例如,CTLA-4共刺激阻滞剂包括一个或多个取代,包括但不限于A29K、A29N、A29E、A29W、A29F、A29Y、A29H、A29Q、A29R、T30D、T30V、T30A、T30N、T30E、T30H、T30R、E31I、E31M、E31T、E31V、E31D、R33F、R33T、R33M、R33W、R33I、R33Y、R33L、R33E、R33Q、T35E、T35V、T35M、T35D、T35F、T35Y、A49T、A49F、A49Y、A49W、A49D、A49E、T51V、T51L、T51N、T51H、T51Q、T51E、T51S、T51R、T51D、M53E、M53Q、M53Y、M53W、M53F、M53H、T59V、T59L、T59N、T59Y、T59H、T59Q、T59I、L61D、L61E、L61I、L61A、L61F、L61G、L61H、L61K、L61M、L61N、L61P、L61Q、L61R、L61S、L61T、L61V、L61W、L61Y、D63E、S64K、S64R、S64Y、K93D、K93E、K93F、K93H、K93Q、K93R、K93T、K93V、K93W、K93Y、K93N、K93S、E95D、E95Q、E95Y、E95H、E95L、M97F、M97D、M97N、M97I、M97V、Y98F、Y98W、Y102F、Y102W、Y103F、Y103W、Y103H、Y103D、Y103E、Y103N、Y103Q、L104D、L104E、L104V、L104M、L104Y、L104W、L104F、L104H、G105D、G105E、I106E和I106Y中的一个或多个。在一些实施方案中,CTLA-4共刺激阻滞剂包含选自A29H、A29K、A29Y、T51N、L61E、L61Q、K93Q、K93I、L104H、L104E和Y103Q的至少一个CTLA4取代。

[0227] 在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂包含与SEQ ID NO:22同一的序列。在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂包含与SEQ ID NO:22约或至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列。在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂包含在SEQ ID NO:22中的约、至少约或至多约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35或40个氨基酸取代。在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂包含与SEQ ID NO:23同一的序列。在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂包含与SEQ ID NO:23约或至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列。在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂包含在SEQ ID NO:23中的约、至少约或至多约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35或40个氨基酸取代。在一些实施方案中,氨基酸取代是保守性氨基酸取代。

[0228] 在某些实施方案中,本文提供的治疗方法包括在受试者被诊断患有免疫相关病症或疾病之前向受试者施用CTLA4共刺激阻滞剂。在某些实施方案中,本文提供的治疗方法包括在受试者被诊断患有免疫相关病症或疾病之后向受试者施用CTLA4共刺激阻滞剂。在某

些实施方案中,本文提供的治疗方法包括在移植前向移植接受者施用CTLA4共刺激阻滞剂。在一些实施方案中,可以在移植前1天、移植前2天、移植前3天、移植前4天、移植前1天和2天、移植前2天和3天、移植前3天和4天、移植前1天及移植前2天和3天,或移植前1天和移植前2天及移植前3天和移植前4天向受者施用CTLA4共刺激阻滞剂。在一个具体实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂可在移植前1天和移植前2天施用于受者。在特定实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂在移植手术当天施用。

[0229] 在某些实施方案中,本文提供的治疗方法包括在移植后向移植接受者施用CTLA4共刺激阻滞剂。在一些实施方案中,可以在移植后1天、移植后2天、移植后3天、移植后4天、移植后5天、移植后6天、移植后7天、移植后8天、移植后9天、移植后10天、移植后11天、移植后12天、移植后13天、移植后14天、移植后15天、移植后16天、移植后17天、移植后18天、移植后19天、移植后20天、移植后21天、移植后22天、移植后23天、移植后24天、移植后25天、移植后26天、移植后27天、移植后28天、移植后29天和/或移植后30天向受者施用CTLA4共刺激阻滞剂。在具体实施方案中,在移植当天、移植后1天、移植后2天和/或移植后4天施用CTLA4共刺激阻滞剂。

[0230] 在某些实施方案中,可以施用测试剂量的CTLA4共刺激阻滞剂。在某些实施方案中,测试剂量的施用是任选的。在某些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂可以向受试者以足够高以诱导缓解的剂量(负荷剂量)施用,接着是较低频率的给药,诸如但不限于每月一次、每两个月一次或每三个月一次。

[0231] 在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂以本领域已知的便利方式施用于受试者,包括皮下、静脉内、血管内、局部、动脉内、颅内、肌内、口服、眶内、通过吸入、经皮或腹膜内。在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂经静脉内施用。在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂以30分钟静脉输注的形式经静脉内施用。在一些实施方案中,在第一次输注后约2周和4周和/或在此后每4周施用CTLA4共刺激阻滞剂。在一些实施方案中,每周一次通过皮下注射施用CTLA4共刺激阻滞剂。在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂在有或没有静脉负荷剂量的情况下开始。在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂以单次静脉内输注开始,接着在静脉内输注当天内进行第一次皮下(例如,125mg)注射。在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂以约500mg(例如,小于60kg的受试者)、750mg(例如,60至100kg的受试者)或1000mg(例如,超过100kg的受试者)的剂量施用。在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂在小瓶中(例如,在250mg小瓶中)提供。在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂作为冻干粉提供。在一些实施方案中,在CTLA4共刺激阻滞剂重构后,每毫升含有25mg(250mg/10mL)的CTLA4共刺激阻滞剂。在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂以125mg/mL单剂量预装玻璃注射器的形式提供。

[0232] 在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂以每天、每剂、每周或每月约、至少约或至多约100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1000mg或超过1000mg的量施用。

[0233] 在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂的剂量范围为0.0001至100mg/kg体重或更大,例如0.1、1、10或50mg/kg体重。在一些实施方案中,剂量范围为1至10mg/kg。在一些实施方案中,仅向受试者施用单剂量的CTLA4共刺激阻滞剂。在一些实施方案中,向受试者施用多剂量的CTLA4共刺激阻滞剂。在一些实施方案中,施用之间经过的时间小于1小时、约1

小时、约1-2小时、约2-3小时、约3-4小时、约6小时、约12小时、约24小时、约48小时、约2-4天、约4-6天、约1周、约2周或超过2周。

[0234] 在一些实施方案中,CTLA-4共刺激阻滞剂以约1ng/kg体重至约100mg/kg体重的范围施用于受试者,无论是通过一次还是多次施用。在一些实施方案中,CTLA-4共刺激阻滞剂以施用CTLA4共刺激阻滞剂的每天、每剂、每周或每月约1ng/kg体重至约10mg/kg体重、约1ng/kg体重至约1mg/kg体重、约1ng/kg体重至约100μg/kg体重、约1ng/kg体重至约10μg/kg体重、约1ng/kg体重至约1μg/kg体重、约1ng/kg体重至约100ng/kg体重、约1ng/kg体重至约10ng/kg体重、约10ng/kg体重至约100mg/kg体重、约10ng/kg体重至约10mg/kg体重、约10ng/kg体重至约1mg/kg体重、约10ng/kg体重至约100μg/kg体重、约10ng/kg体重至约10μg/kg体重、约10ng/kg体重至约1μg/kg体重、10ng/kg体重至约100ng/kg体重、约100ng/kg体重至约100mg/kg体重、约100ng/kg体重至约10mg/kg体重、约100ng/kg体重至约1mg/kg体重、约100ng/kg体重至约100μg/kg体重、约100ng/kg体重至约10μg/kg体重、约100ng/kg体重至约1μg/kg体重、约1μg/kg体重至约100mg/kg体重、约1μg/kg体重至约10mg/kg体重、约1μg/kg体重至约1mg/kg体重、约1μg/kg体重至约100μg/kg体重、约1μg/kg体重至约10μg/kg体重、约10μg/kg体重至约100mg/kg体重、约10μg/kg体重至约10mg/kg体重、约10μg/kg体重至约1mg/kg体重、约10μg/kg体重至约100μg/kg体重、约100μg/kg体重至约100mg/kg体重、约100μg/kg体重至约10mg/kg体重、约100μg/kg体重至约1mg/kg体重、约1mg/kg体重至约100mg/kg体重的范围施用。

[0235] 在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂以0.1至20.0mg/kg患者体重/天(例如,0.5至10.0mg/kg/天)的量施用。在一些实施方案中,CTLA-4共刺激阻滞剂以下述量施用于受试者:0.1至100mg/kg受试者体重、约0.5至5mg/kg受试者体重、约5至10mg/kg受试者体重、约10至15mg/kg受试者体重、约15至20mg/kg受试者体重、约20至25mg/kg受试者体重、约25至30mg/kg受试者体重、约30至35mg/kg受试者体重、约35至40mg/kg受试者体重、约40至45mg/kg受试者体重、约45至50mg/kg受试者体重、约50至55mg/kg受试者体重、约55至60mg/kg受试者体重、约60至65mg/kg受试者体重、约65至70mg/kg受试者体重、约70至75mg/kg受试者体重、约75至80mg/kg受试者体重、约80至85mg/kg受试者体重、约85至90mg/kg受试者体重、约90至95mg/kg受试者体重、约95至100mg/kg受试者体重、约2至10mg/kg受试者体重、约0.1至4mg/kg受试者体重、约0.1至0.5mg/kg受试者体重、约0.5至1.0mg/kg受试者体重、约1.0至1.5mg/kg受试者体重、约1.5至2.0mg/kg受试者体重、约2.0至2.5mg/kg受试者体重、约2.5至3.0mg/kg受试者体重、约3.0至3.5mg/kg受试者体重、约3.5至4.0mg/kg受试者体重、约4.0至4.5mg/kg受试者体重、约4.5至5.0mg/kg受试者体重、约5.0至5.5mg/kg受试者体重、约5.5至6.0mg/kg受试者体重、约6.0至6.5mg/kg受试者体重、约6.5至7.0mg/kg受试者体重、约7.0至7.5mg/kg受试者体重、约7.5至8.0mg/kg受试者体重、约8.0至8.5mg/kg受试者体重、约8.5至9.0mg/kg受试者体重、约9.0至9.5mg/kg受试者体重、约9.5至10.0mg/kg受试者体重、约0.1至2mg/kg受试者体重、约2至4mg/kg受试者体重、约4至6mg/kg受试者体重、约6至8mg/kg受试者体重、约8至10mg/kg受试者体重、约10至12mg/kg受试者体重、约12至14mg/kg受试者体重、约14至16mg/kg受试者体重、约16至18mg/kg受试者体重、约18至20mg/kg受试者体重、约0.5mg/kg受试者体重、2mg/kg受试者体重、10mg/kg受试者体重、约

0.5mg/kg至100受试者体重、约0.5至10mg/kg受试者体重、约0.1至20mg/kg受试者体重、对于体重小于60kg的受试者约500mg、对于体重60-100kg的受试者约750mg或对于体重大于100kg的受试者1000mg。

[0236] 在一些实施方案中,CTLA4共刺激阻滞剂(例如,贝拉西普和/或阿巴西普)与抗CD2抗体或其抗原结合片段以每天、每次CTLA4共刺激阻滞剂施用、每周或每月约、至少约或至多约10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg或30mg/kg(或介于之间的任何整数)的量以组合疗法施用。

[0237] 5.3.9免疫抑制疗法

[0238] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括施用抗CD2抗体或其抗原片段、CTLA-4共刺激阻滞剂和另一种活性剂。在一些实施方案中,另一种活性剂在抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂施用于受试者之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,另一种活性剂在抗CD2抗体或其抗原结合片段施用于受试者之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,另一种活性剂在CTLA-4共刺激阻滞剂施用于受试者之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,另一种活性剂包括甲氨蝶呤、非甾体抗炎药(NSAID)、减轻疼痛的药剂、皮质类固醇、TNF阻断剂、硫唑嘌呤、氯喹、金、羟氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶和/或阿那白滞素中的一种或多种。NSAID的实例包括但不限于阿司匹林、布洛芬、萘普生、非诺洛芬、酮洛芬、氟比洛芬、奥沙普秦、吲哚美辛、舒林酸、依托度酸、双氯芬酸、吡罗昔康、美洛昔康、替诺昔康、屈昔康、氯诺昔康、伊索昔康、甲芬那酸、甲氯芬那酸、氟芬那酸、托芬那酸、塞来昔布、罗非考昔、伐地考昔、帕瑞考昔、罗美昔布、依托考昔、尼美舒利、利考芬酸和尼氟酸。在一些实施方案中,另一种活性剂是免疫抑制疗法。免疫抑制疗法可以是任何经FDA批准的用于治疗或预防受试者的免疫相关病症或疾病的治疗(例如,指示减少移植排斥)。免疫抑制疗法的非限制性实例包括钙调神经磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司或环孢菌素)、抗增殖剂(例如,抗代谢物诸如麦考酚酯、6-巯基嘌呤或其前药硫唑嘌呤)、环磷酰胺、哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)抑制剂(例如,西罗莫司、雷帕霉素)、类固醇(例如,强的松)、细胞周期抑制剂(硫唑嘌呤或吗替麦考酚酯)、淋巴细胞耗竭剂(例如,抗胸腺细胞球蛋白或抗体,诸如阿仑单抗(alemtuzumab)或巴利昔单抗(basiliximab))和共刺激阻断剂。参见,例如,Chung等人(2020),Ann Transl Med;8(6):409;van der Mark等人(2020),Eur Respir Rev;29:190132和Benvenuto等人(2018),J Thorac Dis 10:3141-3155。

[0239] 免疫抑制疗法可以作为诱导疗法(在围手术期或在手术后立即)作为维持剂量或用于急性免疫相关疾病(例如,急性排斥)施用。诱导疗法通常包括巴利昔单抗、抗胸腺细胞球蛋白或阿仑单抗。免疫抑制疗法也可以作为维持疗法施用,通常需要维持疗法在受试者的生命中持续。维持免疫抑制疗法通常包括钙调磷酸酶抑制剂(他克莫司或环孢菌素)、抗增殖剂(麦考酚酯或硫唑嘌呤)和皮质类固醇。对急性排斥的免疫抑制疗法通常包括胸腺球蛋白或麦考酚酯。参见,例如,Chung等人(2020),Ann Transl Med;8:409和Benvenuto等人(2018)J Thorac Dis10:3141-3155

[0240] 免疫抑制剂的非限制性实例包括(1)抗代谢物,诸如嘌呤合成抑制剂(诸如肌苷一磷酸脱氢酶(IMPDH)抑制剂,例如硫唑嘌呤、麦考酚酯和吗替麦考酚酯)、嘧啶合成抑制剂(例如,来氟米特和特立氟胺)和抗叶酸剂(例如甲氨蝶呤);(2)钙调磷酸酶抑制剂,诸如他克莫司、环孢菌素A、吡美莫司和伏环孢素(voclosporin);(3)TNF- α 抑制剂,诸如沙利度胺

(thalidomide) 和来那度胺 (lenalidomide); (4) IL-1 受体拮抗剂, 诸如阿那白滞素 (anakinra); (5) 哺乳动物雷帕霉素靶标 (mTOR) 抑制剂, 诸如雷帕霉素 (西罗莫司)、地福莫司 (deforolimus)、依维莫司、替西罗莫司 (temsirolimus)、佐他莫司 (zotarolimus) 和优美莫司 (biolimus) A9; (6) 皮质类固醇, 诸如强的松; 以及 (7) 针对多种细胞或血清靶标中的任何一种的抗体 (包括抗淋巴细胞球蛋白和抗胸腺细胞球蛋白)。

[0241] 非限制性的示例性细胞靶标及其各自的抑制剂化合物包括但不限于补体组分5 (例如依库丽单抗 (eculizumab)); 肿瘤坏死因子 (TNF) (例如, 英夫利昔单抗 (infliximab)、阿达木单抗 (adalimumab)、赛妥珠单抗 (certolizumab pegol)、阿非莫单抗 (afelimomab) 和戈利木单抗 (golimumab)); IL-5 (例如美泊利单抗 (mepolizumab)); IgE (例如奥马珠单抗 (omalizumab)); BAYX (例如, 奈瑞莫单抗 (nerelimomab)); 干扰素 (例如, 法拉莫单抗 (faralimomab)); IL-6 (例如, 艾西莫单抗 (elsilimomab)); IL-12 和 IL-13 (例如, 来瑞组单抗 (lebrikizumab) 和优特克单抗 (ustekinumab)); CD3 (例如, 莫罗单抗 (muromonab) -CD3、奥昔组单抗 (otelixizumab)、替利组单抗 (teplizumab)、维西珠单抗 (visilizumab)); CD4 (例如, 克立昔单抗 (clenoliximab)、凯利昔单抗 (keliximab) 和扎木单抗 (zanolimumab)); CDI 1a (例如, 依法珠单抗 (efalizumab)); CD18 (例如, 厄利珠单抗 (erlizumab)); CD20 (例如, 阿夫土珠单抗 (afutuzumab)、奥克莱珠单抗 (ocrelizumab)、帕考珠单抗 (pascolizumab)); CD23 (例如, 鲁昔单抗 (lumiliximab)); CD40 (例如, 替奈昔单抗 (teneliximab)、托拉珠单抗 (toralizumab)); CD62L/L-选择素 (例如, 阿塞珠单抗 (aselizumab)); CD80 (例如, 加利昔单抗 (galiximab)); CD147/basigin (例如, 加维莫单抗 (gavilimomab)); CD154 (例如, 卢利珠单抗 (ruplizumab)); BLYS (例如, 贝利木单抗 (belimumab)); CTLA-4 (例如, 伊匹单抗 (ipilimumab)、曲美木单抗 (tremelimumab)); CAT (例如, 柏替木单抗 (bertilimumab)、乐德木单抗 (lerdelimumab)、美替木单抗 (metelimumab)); 整联蛋白 (例如, 那他珠单抗 (natalizumab)); IL-6 受体 (例如, 托珠单抗 (tocilizumab)); LFA-1 (例如, 奥度莫单抗 (odulimomab)); 和 IL-2 受体/CD25 (例如, 巴利昔单抗、达克珠单抗 (daclizumab)、伊诺莫单抗 (inolimomab))。

[0242] 在一些实施方案中, 免疫抑制疗法是称为疾病缓解抗风湿药 (DMARD) 的非特异性细胞毒性免疫抑制药物, 诸如甲氨蝶呤、英夫利昔单抗、环磷酰胺、硫唑嘌呤、环孢菌素 A、柳氮磺吡啶、羟氯喹、来氟米特、依那西普和肿瘤坏死因子- α (TNF α) 或其他细胞因子阻断剂或拮抗剂。在一些实施方案中, 在向受试者施用免疫抑制疗法的天数, 施用于受试者的免疫抑制疗法 (例如, DMARD) 的量约为或至少约 1 至约 5000mg/天、约 1 至 10mg/天、约 10 至 50mg/天、约 50 至 100mg/天、约 100 至 150mg/天、约 150 至 200mg/天、约 200 至 250mg/天、约 250 至 300mg/天、约 300 至 350mg/天、约 350 至 400mg/天、约 400 至 450mg/天、约 450 至 500mg/天、约 500 至 550mg/天、约 550 至 600mg/天、约 600 至 650mg/天、约 650 至 700mg/天、约 700 至 750mg/天、约 750 至 800mg/天、约 800 至 850mg/天、约 850 至 900mg/天、约 900 至 950mg/天、约 950 至 1000mg/天、约 1000 至 1100mg/天、约 1100 至 1200mg/天、约 1200 至 1300mg/天、约 1300 至 1400mg/天、约 1400 至 1500mg/天、约 1500 至 1600mg/天、约 1600 至 1700mg/天、约 1700 至 1800mg/天、约 1800 至 1900mg/天、约 1900 至 2000mg/天、约 2000 至 2500mg/天、约 2500 至 3000mg/天、约 3000 至 3500mg/天、约 3500 至 4000mg/天、约 4000 至 4500mg/天或约 4500 至 5000mg/天。

[0243] 在一些实施方案中, 施用于受试者的免疫抑制疗法 (例如, DMARD) 的量为每周约

0.1至40mg、每周约5至30mg、每周约0.1至5mg、每周约5至10mg、每周约10至15mg、每周约15至20mg、每周约20至25mg、每周约25至30mg、每周约30至35mg、每周约35至40mg、每周约10至30mg、每周约10至100mg、每周约50mg、每周约0.1至50mg/kg体重。

[0244] 5.3.10环磷酰胺

[0245] 如本文所用,环磷酰胺是给予受者以阻抑免疫系统的化合物。在一些实施方案中,施用环磷酰胺(2-[双(2-氯乙基)氨基]四氢-2H-1,3,2-氧氮磷环2-氧化物一水合物)以诱导对移植器官(例如,肝脏或肾脏)的耐受性,并且环磷酰胺的商品名包括Cytosan®、Neosar®和Endoxan®。

[0246] 在某些实施方案中,本文提供的方案包括在移植前向移植接受者施用环磷酰胺。在某些实施方案中,本文提供的方案包括施用环磷酰胺以治疗或预防免疫相关病症或疾病。在一些实施方案中,环磷酰胺可以在移植后三天、移植后四天、移植后五天、移植后六天、移植后三天和四天、移植后五天和六天、移植后三天和四天和五天,或移植后四天和五天和六天施用于受者。在一个具体实施方案中,环磷酰胺可以在移植后四天和五天施用于受者。在具体实施方案中,环磷酰胺首先在移植后三天、四天、五天、六天或七天施用于受者。

[0247] 在特定实施方案中,根据本文所述的方法治疗的受者具有30或更高的MELD评分并且所述方法包括首先在移植后1-2天、移植后2-4天、移植后4-6天、移植后6-8天、移植后8-10天、移植后10-12天、移植后12-14天、移植后14-16天、移植后16-18天、移植后18-20天、移植后20-22天、移植后22-24天、移植后24-26天、移植后26-28天、移植后28-30天或移植后30天以上向受者施用环磷酰胺。

[0248] 在特定实施方案中,根据本文所述的方法治疗的受者具有30或更低的MELD评分并且所述方法包括首先在移植后1天、移植后2天、移植后3天、移植后4天、移植后5天、移植后6天、移植后7天、移植后8天、移植后9天、移植后10天、移植后11天、移植后12天、移植后13天、移植后14天或移植后14天以上向受者施用环磷酰胺。

[0249] 在某些实施方案中,环磷酰胺可以20mg/kg/剂、25mg/kg/剂、30mg/kg/剂、35mg/kg/剂、40mg/kg/剂、45mg/kg/剂、50mg/kg/剂、55mg/kg/剂、56mg/kg/剂、57mg/kg/剂、58mg/kg/剂、59mg/kg/剂、60mg/kg/剂、61mg/kg/剂、62mg/kg/剂、63mg/kg/剂、64mg/kg/剂、65mg/kg/剂、70mg/kg/剂、75mg/kg/剂、80mg/kg/剂、85mg/kg/剂或90mg/kg/剂的剂量施用于移植接受者或者可以施用以治疗或预防受试者的免疫相关病症或疾病。在某些实施方案中,环磷酰胺可以以20-30mg/kg/剂、25-35mg/kg/剂、30-40mg/kg/剂、35-45mg/kg/剂、40-50mg/kg/剂、45-55mg/kg/剂、50-60mg/kg, 55-65mg/kg/剂、60-70mg/kg/剂、65-75mg/kg/剂、70-80mg/kg/剂、75-85mg/kg/剂或80-90mg/kg/剂的剂量范围施用。在一个具体实施方案中,环磷酰胺可以以40mg/kg/剂的剂量施用。

[0250] 在某些实施方案中,环磷酰胺可以本领域已知的便利方式施用,包括皮下、静脉内、血管内、局部、动脉内、颅内、肌肉内、口服、眶内、通过吸入、经皮、腹膜内或通过允许受试者对环磷酰胺产生适当作用的施途径。在一个具体实施方案中,环磷酰胺是静脉内施用。在特定实施方案中,环磷酰胺在一小时内静脉内施用。在一些实施方案中,环磷酰胺在抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂施用于受试者之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,环磷酰胺在抗CD2抗体或其抗原结合片段施用于受试者之前、期间

或之后施用。在一些实施方案中，环磷酰胺在CTLA-4共刺激阻滞剂施用于受试者之前、期间或之后施用。

[0251] 5.3.11 钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)

[0252] 在一些实施方案中，本文所述的治疗方法还包括向受试者施用钙调磷酸酶抑制剂。在具体实施方案中，钙调磷酸酶抑制剂是他克莫司。如本文所用，他克莫司是大环内酯类抗生素，其可施用于受试者以阻抑免疫系统。他克莫司的作用方式类似于CyA(环孢菌素A，另一种钙调磷酸酶抑制剂)，并且他克莫司的品牌名称包括

Prograf®、Adport®、Advagraf®、Protopic®、Astagraf XL®、Modigraf®和Envarsus XR®。

钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)可施用于受试者以治疗或预防免疫相关疾病或病症，或者可以包含在术后治疗方案中以阻抑免疫系统并抑制受者中移植物抗宿主病的发展。在一些实施方案中，钙调磷酸酶抑制剂的施用包括向受试者施用钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)的恒定过程，接着是逐渐减量过程。

[0253] 在某些实施方案中，本文提供的方案包括施用环磷酰胺以治疗或预防免疫相关病症或疾病。在某些实施方案中，本文提供的方案包括向移植接受者施用钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)。在某些实施方案中，可以在移植前1天、移植前2天、移植前3天、移植前1天和2天、移植前1天和3天，或移植前1天和2天和3天首先施用钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)。在一个具体实施方案中，可以在移植前1天首先向受者施用钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)。在具体实施方案中，钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)在围移植期(即，移植手术前后)尽快施用。在具体实施方案中，钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)在器官(例如，肝脏)移植再灌注后不迟于24小时施用。在某些实施方案中，本文提供的术后治疗方案包括向移植接受者施用钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)。在某些实施方案中，可在移植当天、移植手术后1天、移植手术后2天、移植手术后3天、移植手术后4天、移植手术后5天、移植手术后6天、移植手术后7天、移植手术后8天、移植手术后9天、移植手术后10天、移植手术后11天、移植手术后12天、移植手术后13天、移植手术后14天、移植手术后15天、移植手术后16天、移植手术后17天、移植手术后18天、移植手术后19天、移植手术后20天、移植手术后21天、移植手术后22天、移植手术后23天、移植手术后24天、移植手术后25天、移植手术后26天、移植手术后27天、移植手术后28天、移植手术后29天、移植手术后30天、移植手术后1个月、移植手术后2个月、移植手术后3个月、移植手术后4个月、移植手术后5个月、移植手术后6个月、移植手术后7个月、移植手术后8个月、移植手术后9个月、移植手术后10个月、移植手术后11个月、移植手术后12个月、移植手术后13个月、移植手术后14个月、移植手术后15个月、移植手术后16个月、移植手术后17个月或移植手术后18个月施用钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)。

[0254] 在某些实施方案中，可以施用单剂量的他克莫司。在某些实施方案中，可以施用多剂量的钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)。在某些实施方案中，可以施用恒定剂量的钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)。在某些实施方案中，可施用钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)的逐渐减量过程。在某些实施方案中，可以施用恒定剂量的钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)，接着是钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)的逐渐减量过程。

[0255] 在具体实施方案中，钙调磷酸酶抑制剂(例如，他克莫司)可以每天一次的频率施用。在某些实施方案中，他克莫司可以每天两次的频率施用。在某些实施方案中，他克莫司

可以每天两次的频率施用(例如,从移植当天开始)。在某些实施方案中,钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)可以每天两次以0.1mg/kg/剂、0.2mg/kg/剂、0.3mg/kg/剂、0.4mg/kg/剂、0.5mg/kg/剂、0.6mg/kg/剂、0.7mg/kg/剂、0.8mg/kg/剂、0.9mg/kg/剂、1mg/kg/剂、0.1-0.5mg/kg/剂、0.5-1mg/kg/剂、0.2-0.6mg/kg/剂、0.3-0.7mg/kg/剂、0.4-0.8mg/kg/剂或0.1-1mg/kg/剂的剂量施用。在一个具体实施方案中,钙调磷酸酶抑制剂是他克莫司并且每天两次以至少0.5mg/kg/剂的剂量口服施用。

[0256] 在某些实施方案中,钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)可以足够的剂量施用于受试者以获得1-5ng/ml、5-10ng/ml、10-15ng/ml、1-11ng/ml、2-12ng/ml、3-13ng/ml、4-14ng/ml、5-15ng/ml、6-16ng/ml、7-17ng/ml、8-18ng/ml、9-19ng/ml、10-20ng/ml或15-20ng/ml的目标血谷水平。在一个具体实施方案中,目标血谷水平可以是10-15ng/ml。在具体实施方案中,钙调磷酸酶抑制剂是他克莫司并且以足以将血清谷浓度维持在4-11ng/mL的范围内的剂量施用于受试者。

[0257] 在某些实施方案中,钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)可以本领域已知的便利方式施用于受试者,包括皮下、静脉内、血管内、局部、动脉内、颅内、肌肉内、口服、眶内、通过吸入、经皮或腹膜内,或通过允许受者对钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)产生适当作用的施用途径。在一个具体实施方案中,钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)可以口服施用。在一个具体实施方案中,钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)可以静脉内施用。

[0258] 在具体实施方案中,在受试者接受器官移植之后,在受试者被诊断患有免疫相关疾病或病症之后,或者在受试者根据本文所述的方法治疗了免疫相关疾病或病症之后3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1-2个月、2-3个月、3-4个月、4-5个月、5-6个月、6-7个月、7-8个月、8-9个月、9-10个月、10-11个月、11-12个月、12-13个月、13-14个月、14-15个月、15-16个月、16-17个月、17-18个月、18-19个月、19-20个月、20-21个月、21-22个月、22-23个月或23-24个月,受试者戒断钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)。在具体实施方案中,在受试者接受器官移植之后,在受试者被诊断患有免疫相关疾病或病症之后,或者在受试者根据本文所述的方法治疗了免疫相关疾病或病症之后六个月开始戒断。在具体实施方案中,只有在根据2016年班夫标准(如Demetris等人, Am J Transplant. 2016Oct;16(10):2816-2835中所述)确定在六个月时从受者取得的活检没有排斥时和/或受者维持稳定的移植物功能时才开始戒断。

[0259] 在具体实施方案中,钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)的剂量在戒断开始后每2、3、4、5或6个月减少一次。

[0260] 在特定实施方案中,戒断方案包括一个或多个减少施用频率的步骤,例如,将施用频率从每天两次减少到每天一次,从每天一次减少到每隔一天一次,从每天一次减少到每周三次,从每周三次减少到每周两次,从每周两次减少到每周一次,从每周一次减少到每隔一周一次。在具体实施方案中,戒断方案包括减少钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)的日剂量的步骤,例如,将初始日剂量减少10-20%、20-30%、30-40%、40-50%、50-60%、60-70%、70-80%、80-90%或超过90%。在特定实施方案中,戒断方案包括将钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)的日剂量降低约25%的步骤。

[0261] 在特定实施方案中,在受试者接受器官移植之后,在受试者被诊断患有免疫相关疾病或病症之后,或者在受试者根据本文所述的方法治疗了免疫相关疾病或病症之后后约

12-15个月、15-18个月、18-21个月或21-24个月停止施用钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)。在一个具体实施方案中,在受试者接受器官移植之后,在受试者被诊断患有免疫相关疾病或病症之后,或者在受试者根据本文所述的方法治疗了免疫相关疾病或病症之后18个月停止施用钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)。在具体实施方案中,只有在根据2016年班夫标准(如Demetris等人,Am J Transplant.2016Oct;16(10):2816-2835中所述)确定在18个月时从受者取得的活检没有排斥时才停止施用钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)。

[0262] 示例性戒断方案包括以下步骤:(i)在三个月内(例如,从移植后第6个月到第9个月)将每日两次的初始他克莫司剂量减少到每天一次,每日剂量的四分之三;(ii)在三个月内(例如,从移植后第9个月到第12个月)将剂量进一步减少到每周三次;(iii)在三个月内(例如,从移植后第12个月到第15个月)将剂量进一步减少到每周两次;(iv)在三个月内(例如,从移植后第15个月到第18个月)将剂量进一步减少到每周一次;(v)在受试者接受器官移植之后,在受试者被诊断患有免疫相关疾病或病症之后,或者在受试者根据本文所述的方法治疗了免疫相关疾病或病症之后18个月停止施用他克莫司。

[0263] 在某些实施方案中,可以使用替代化合物代替钙调磷酸酶抑制剂。这些化合物可包括西罗莫司和依维莫司。在某些实施方案中,钙调磷酸酶抑制剂可以是环孢菌素(Gengraf®、Neoral®和Sandimmune®)并且可以用来代替他克莫司。在一些实施方案中,钙调磷酸酶抑制剂在抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂施用于受试者之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,钙调磷酸酶抑制剂在抗CD2抗体或其抗原结合片段施用于受试者之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,钙调磷酸酶抑制剂在CTLA-4共刺激阻滞剂施用于受试者之前、期间或之后施用。

[0264] 5.3.12类固醇

[0265] 如本文所用,类固醇是施用于受试者以治疗或预防免疫相关的免疫病症或疾病的化合物。在一些实施方案中,将类固醇施用于器官(例如,肝脏或肾脏)移植的受者以阻抑免疫系统。强的松是一种皮质类固醇,化学名称为17,21-二羟孕甾-1,4-二烯-3,11,20-三酮($C_{21}H_{26}O_5$)。强的松的品牌名称包括Deltasone®、Sterapred®、Rayos®、Prednicot®和Meticorten®。

[0266] 在某些实施方案中,本文提供的治疗方法包括将皮质类固醇施用于受试者以治疗或预防免疫相关的免疫病症或疾病或施用于移植接受者。在某些实施方案中,可以在移植当天、移植手术后1天、移植手术后2天、移植手术后3天、移植手术后4天、移植手术后5天、移植手术后6天、移植手术后7天、移植手术后8天、移植手术后9天、移植手术后10天、移植手术后11天、移植手术后12天、移植手术后13天、移植手术后14天、移植手术后15天、移植手术后16天、移植手术后17天、移植手术后18天、移植手术后19天、移植手术后20天、移植手术后21天、移植手术后22天、移植手术后23天、移植手术后24天、移植手术后25天、移植手术后26天、移植手术后27天、移植手术后28天、移植手术后29天或移植手术后30天施用皮质类固醇。

[0267] 在某些实施方案中,可以在移植手术当天至移植手术后5天、移植手术当天至移植手术后10天、移植手术当天至移植手术后15天、移植手术当天至移植手术后20天、移植手术当天至移植手术后25天或移植手术当天至移植手术后30天施用皮质类固醇。在具体实施方案中,在移植手术当天和移植手术后第2-7天施用皮质类固醇。在特定实施方案中,施用于

患者的皮质类固醇的剂量从移植当天到移植后一个月减少。

[0268] 在某些实施方案中,可以施用单剂量的皮质类固醇。在某些实施方案中,可以施用多剂量的皮质类固醇。在某些实施方案中,可以施用恒定剂量的皮质类固醇。在某些实施方案中,可以施用一个脉冲的皮质类固醇。在某些实施方案中,可以施用皮质类固醇的逐渐减量过程。在某些实施方案中,可以施用恒定剂量的皮质类固醇,接着是皮质类固醇的逐渐减量过程。在某些实施方案中,可以施用恒定剂量的皮质类固醇,多个脉冲的皮质类固醇和皮质类固醇的逐渐减量过程。

[0269] 在某些实施方案中,皮质类固醇可以向受试者以0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1.0mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2.0mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg或3.0mg/kg的剂量施用。在一个具体实施方案中,类固醇可以向受试者以2mg/kg的剂量施用。

[0270] 在某些实施方案中,皮质类固醇可以向受试者以100mg/剂、200mg/剂、300mg/剂、400mg/剂、500mg/剂、600mg/剂、700mg/剂、800mg/剂、900mg/剂或1000mg/剂的量施用。在一个具体实施方案中,皮质类固醇可以以500mg/剂的脉冲剂量施用。在某些实施方案中,可以在移植当天、移植后1天、移植后2天、移植后3天、移植后4天、移植后5天、移植后6天、移植后7天、移植后8天、移植后9天、移植后10天、移植后11天、移植后12天、移植后13天、移植后14天、移植后15天、移植当天和移植后1天和2天、移植后3天和4天和5天、移植后6天和7天和8天、移植后9天和10天和11天、移植后10天和11天和12天、移植后11天和12天和13天或移植后13天和14天和15天施用一个脉冲的皮质类固醇。在一个具体实施方案中,在移植当天施用一个脉冲的皮质类固醇。在一个具体实施方案中,在移植后10天和11天和12天施用一个脉冲的皮质类固醇。

[0271] 在某些实施方案中,类固醇可以恒定剂量施用于受试者。施用恒定剂量的持续时间可以是1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天。在某些实施方案中,施用于受试者的皮质类固醇可以逐渐减量至停药。在某些实施方案中,这个逐渐减量过程可以发生在5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天内。在一个具体实施方案中,逐渐减量过程可以发生在10天内。在一个具体实施方案中,逐渐减量过程可以发生在20天内。

[0272] 在某些实施方案中,对于逐渐减量过程,施用于受试者的皮质类固醇可以减少0.01mg/kg每天、0.02mg/kg每天、0.03mg/kg每天、0.04mg/kg每天、0.05mg/kg每天、0.06mg/kg每天、0.07mg/kg每天、0.08mg/kg每天、0.09mg/kg每天、0.1mg/kg每天、0.2mg/kg每天、0.3mg/kg每天、0.4mg/kg每天、0.5mg/kg每天、0.6mg/kg每天、0.7mg/kg每天、0.8mg/kg每天、0.9mg/kg每天、1.0mg/kg每天、1.1mg/kg每天、1.2mg/kg每天、1.3mg/kg每天、1.4mg/kg每天、1.5mg/kg每天、1.6mg/kg每天、1.7mg/kg每天、1.8mg/kg每天、1.9mg/kg每天或2.0mg/kg每天。

[0273] 示例性的类固醇给药方案包括向受试者施用以下剂量:(i)在移植手术当天静脉内施用1000mg甲基强的松龙;(ii)移植手术后第2天口服类固醇250mg,(iii)移植手术后第3天口服类固醇125mg;(iv)移植手术后第4天口服75mg类固醇;(v)移植手术后第5-7天每天

口服60mg类固醇;以及(vi)从移植手术后第7天到一个月每天口服20mg类固醇。

[0274] 在某些实施方案中,皮质类固醇可以本领域已知的便利方式施用于受试者,包括皮下、静脉内、血管内、局部、动脉内、颅内、肌肉内、口服、眶内、通过吸入、经皮或腹膜内,或通过允许受者对皮质类固醇产生适当作用的施用途径。在一个具体实施方案中,皮质类固醇可以口服施用。在一个具体实施方案中,皮质类固醇可以静脉内施用。

[0275] 可用于本文所述的方法中的类固醇的实例包括Deltison[®]、Prednisolone EQL Pharma和Prednisolon Alternova。

[0276] 在一个具体实施方案中,皮质类固醇是强的松。在一个具体实施方案中,脉冲皮质类固醇是甲基强的松。在某些实施方案中,皮质类固醇的施用可以如本文所述进行修改。在一些实施方案中,类固醇在抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂施用于受试者之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,类固醇在抗CD2抗体或其抗原结合片段施用于受试者之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,类固醇在CTLA-4共刺激阻滞剂施用于受试者之前、期间或之后施用。

[0277] 5.3.13环孢菌素

[0278] 可以包括环孢菌素(CyA)以治疗或预防受试者的免疫相关的免疫病症或疾病。可在术后治疗方案中包括环孢菌素(CyA)以阻抑免疫系统并抑制受者中移植物抗宿主病的发展。治疗方案可以包括恒定过程,接着是向受试者施用CyA的逐渐减量过程。在某些实施方案中,在本文提供的方法中,可以使用环孢菌素代替钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)。在一些实施方案中,环孢菌素可用于经历钙调磷酸酶抑制剂的不良事件的受试者。在具体实施方案中,环孢菌素可用于经历他克莫司相关不良事件的受试者。

[0279] 在某些实施方案中,本文提供的术后治疗方案包括向移植接受者施用CyA。在某些实施方案中,可在移植当天、移植手术后1天、移植手术后2天、移植手术后3天、移植手术后4天、移植手术后5天、移植手术后6天、移植手术后7天、移植手术后8天、移植手术后9天、移植手术后10天、移植手术后11天、移植手术后12天、移植手术后13天、移植手术后14天、移植手术后15天、移植手术后16天、移植手术后17天、移植手术后18天、移植手术后19天、移植手术后20天、移植手术后21天、移植手术后22天、移植手术后23天、移植手术后24天、移植手术后25天、移植手术后26天、移植手术后27天、移植手术后28天、移植手术后29天、移植手术后30天、移植手术后1个月、移植手术后2个月、移植手术后3个月、移植手术后4个月、移植手术后5个月、移植手术后6个月、移植手术后7个月、移植手术后8个月、移植手术后9个月、移植手术后10个月、移植手术后11个月、移植手术后12个月、移植手术后13个月、移植手术后14个月、移植手术后15个月、移植手术后16个月、移植手术后17个月或移植手术后18个月施用CyA。

[0280] 在某些实施方案中,可以施用单剂量的CyA。在某些实施方案中,可以施用多剂量的CyA。在某些实施方案中,可以施用恒定剂量的CyA。在某些实施方案中,可以施用CyA的逐渐减量过程。在某些实施方案中,可以施用恒定剂量的CyA,接着是CyA的逐渐减量过程。

[0281] 在某些实施方案中,CyA可以向受试者以2mg/kg/天、2.5mg/kg/天、3mg/kg/天、3.5mg/kg/天、4mg/kg/天、4.5mg/kg/天、5mg/kg/天、5.5mg/kg/天、6mg/kg/天、6.5mg/kg/天、7mg/kg/天、7.5mg/kg/天、8mg/kg/天、8.5mg/kg/天、9mg/kg/天、9.5mg/kg/天、10mg/kg/天、10.5mg/kg/天、11mg/kg/天、11.5mg/kg/天、12mg/kg/天、12.5mg/kg/天、13mg/kg/天、

13.5mg/kg/天、14mg/kg/天、14.5mg/kg/天、15mg/kg/天、15.5mg/kg/天、16mg/kg/天、16.5mg/kg/天、17mg/kg/天、17.5mg/kg/天、18mg/kg/天、2-6mg/kg/天、3-7mg/kg/天、4-8mg/kg/天、5-9mg/kg/天、6-10mg/kg/天、7-11mg/kg/天、8-12mg/kg/天、9-13mg/kg/天、10-14mg/kg/天、11-15mg/kg/天、12-16mg/kg/天、13-17mg/kg/天或14-18mg/kg/天的剂量施用。在一个具体实施方案中,CyA可以向受试者以8mg/kg/天的剂量施用。在一个具体实施方案中,CyA可以向受试者以9mg/kg/天的剂量施用。在一个具体实施方案中,CyA可以向受试者以10mg/kg/天的剂量施用。在一个具体实施方案中,CyA可以向受试者以11mg/kg/天的剂量施用。在一个具体实施方案中,CyA可以向受试者以12mg/kg/天的剂量施用。在一个具体实施方案中,CyA可以向受试者以8-12mg/kg/天的剂量范围施用。

[0282] 在某些实施方案中,CyA可以足够的剂量施用于受试者以获得100-200ng/ml、125-225ng/ml、150-250ng/ml、175-275ng/ml、200-300ng/ml、225-325ng/ml、250-350ng/ml、275-375ng/ml、300-400ng/ml、325-425ng/ml、350-450ng/ml、375-475ng/ml或400-500ng/ml的目标血谷水平。在一个具体实施方案中,目标血谷水平可以是250-350ng/ml。

[0283] 在某些实施方案中,CyA可以恒定剂量施用于受试者。施用恒定剂量的持续时间可以是1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天(例如,在移植后)。在某些实施方案中,CyA可以逐渐减量至停药。在某些实施方案中,该逐渐减量过程可以发生在受试者被诊断患有免疫相关疾病或病症之后,在受试者开始用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂治疗之后,或者在器官或组织移植之后的1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月或18个月内。

[0284] 在某些实施方案中,CyA可以本领域已知的便利方式施用于受试者,包括皮下、静脉内、血管内、局部、动脉内、颅内、肌肉内、口服、眶内、通过吸入、经皮或腹膜内,或通过允许受试者对CyA产生适当作用的施用途径。在一个具体实施方案中,CyA可以口服施用。在一个具体实施方案中,CyA可以静脉内施用。

[0285] 在某些实施方案中,可以使用替代化合物代替CyA。这些化合物可包括他克莫司(Prograf®、Adoport®、Advagraf®、Envarsus®、Modigraf®、Astagraf®)、西罗莫司和依维莫司。在一些实施方案中,环孢菌素在抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂施用于受试者之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,环孢菌素在抗CD2抗体或其抗原结合片段施用于受试者之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,环孢菌素在CTLA-4共刺激阻滞剂施用于受试者之前、期间或之后施用。

[0286] 抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法

[0287] 在一些方面,本文提供的治疗方法包括向受试者施用标准护理抗代谢物疗法。在一些实施方案中,标准护理抗代谢物疗法是麦考酚酯。如本文所用,麦考酚酯可包括在本文提供的治疗方法中以阻抑免疫系统并抑制受试者中移植物抗宿主病的发展。麦考酚酯的品牌名称可包括CellCept®、吗替麦考酚酯Accord、吗替麦考酚酯Sandoz、Myfenax、Myfortic、吗替麦考酚酯Actavis、麦考酚酸Accord、吗替麦考酚酯2care4、吗替麦考酚酯EQL、吗替麦考酚酯Orifarm和Myfortic®麦考酚酸。治疗方案可以包括恒定过程,接着是向受试者施用麦考酚酯的逐渐减量过程。

[0288] 在某些实施方案中,本文提供的术后治疗方案包括向移植接受者施用标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法。在具体实施方案中,首先在移植的肝脏再灌注24小时内向受者施用标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法。在某些实施方案中,可在移植当天、移植手术后1天、移植手术后2天、移植手术后3天、移植手术后4天、移植手术后5天、移植手术后6天、移植手术后7天、移植手术后8天、移植手术后9天、移植手术后10天、移植手术后11天、移植手术后12天、移植手术后13天、移植手术后14天、移植手术后15天、移植手术后16天、移植手术后17天、移植手术后18天、移植手术后19天、移植手术后20天、移植手术后21天、移植手术后22天、移植手术后23天、移植手术后24天、移植手术后25天、移植手术后26天、移植手术后27天、移植手术后28天、移植手术后29天、移植手术后30天、移植手术后1个月、移植手术后2个月、移植手术后3个月、移植手术后4个月、移植手术后5个月、移植手术后6个月、移植手术后7个月、移植手术后8个月、移植手术后9个月、移植手术后10个月、移植手术后11个月、移植手术后12个月、移植手术后13个月、移植手术后14个月、移植手术后15个月、移植手术后16个月、移植手术后17个月或移植手术后18个月施用标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法。

[0289] 在某些实施方案中,可以施用单剂量的标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法。在某些实施方案中,可以施用多剂量的标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法。在某些实施方案中,可以施用恒定剂量的标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法。在某些实施方案中,可以施用标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法的逐渐减量过程。在某些实施方案中,可以施用恒定剂量的标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法,接着是标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法的逐渐减量过程。在某些实施方案中,标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法每天施用两次。

[0290] 在某些实施方案中,标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法可以向受试者以100mg/剂、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、800mg、900mg、1000mg、1100mg、1200mg、1300mg、1400mg、1500mg、1600mg、1700mg、1800mg、1900mg、2000mg、2100mg、2200mg、2300mg、2400mg、2500mg、100-1000mg、200-1200mg、300-1300mg、400-1400mg、500-1500mg、600-1600mg、700-1700mg、800-1800mg、900-1900mg、1000-2000mg、1100-2100mg、1200-2200mg、1300-2300mg、1400-2400mg或1500-2500mg的总日剂量施用。总日剂量可以每天分1、2、3、4剂或更多剂施用。在一个具体实施方案中,标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法向受试者以500-1500的剂量范围每天施用两次。在具体实施方案中,标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法向受试者以每剂250-750mg的剂量范围每天施用两次。在特定实施方案中,麦考酚酸向受试者以约1000mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg、约1400mg、约1500mg、约1600mg、约1700mg、约1800mg、约1900mg或约2000mg的总日剂量施用。在具体实施方案中,麦考酚酸向受试者以约1440mg的总日剂量施用。

[0291] 在某些实施方案中,标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法可以向受试者以恒定剂量施用。施用恒定剂量的持续时间可以是在受试者被诊断患有免疫相关疾病或病症之后,在受试者开始用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂治疗之后,或者在器官或组织移植之后的1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天。在某些实施方案中,将标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法施用于受试者并

且可以逐渐减量至停药。在某些实施方案中,该逐渐减量过程可以发生在受试者被诊断患有免疫相关疾病或病症之后,在受试者开始用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂治疗之后,或者在器官或组织移植之后的1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月或6个月内。

[0292] 在某些实施方案中,标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法可以本领域已知的便利方式施用于受试者,包括皮下、静脉内、血管内、局部、动脉内、颅内、肌肉内、口服、眶内、通过吸入、经皮或腹膜内,或通过允许受试者对标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法产生适当作用的施用途径。在一个具体实施方案中,标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法可以口服施用。在一个具体实施方案中,标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法可以静脉内施用。在某些实施方案中,标准护理抗代谢物(例如麦考酚酯)疗法的施用可以如本文所述进行修改。

[0293] 在一些实施方案中,抗代谢物在抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂施用于受试者之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,抗代谢物在抗CD2抗体或其抗原结合片段施用于受试者之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,抗代谢物在CTLA-4共刺激阻滞剂施用于受试者之前、期间或之后施用。

[0294] 5.3.14mTOR抑制剂

[0295] 在某些实施方案中,本文所述的方法还包括向受试者施用mTOR抑制剂。不受理论的束缚,可以将mTOR抑制剂施用于受试者以抑制T细胞和B细胞活化以治疗或预防受试者的免疫相关病症或疾病,例如预防移植排斥。在某些实施方案中,mTOR抑制剂可与钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)组合使用或者可代替钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)使用。在具体实施方案中,本文呈现的方法中描述的mTOR抑制剂可以是雷帕霉素或依维莫司。在一些实施方案中,mTOR抑制剂可代替钙调磷酸酶抑制剂(例如,他克莫司)用于本文提供的方法中。在一些实施方案中,mTOR抑制剂可用于经历钙调磷酸酶抑制剂的不良事件的受试者。在具体实施方案中,mTOR抑制剂可用于经历他克莫司相关不良事件的受试者。

[0296] 在某些实施方案中,本文提供的术后方案包括在移植后向移植接受者施用雷帕霉素。在某些实施方案中,每天施用雷帕霉素。在某些实施方案中,雷帕霉素的施用可以在移植后立即开始,在受试者被诊断患有免疫相关疾病或病症之后,在受试者开始用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂治疗之后,或者在器官或组织移植之后1天、之后2天、之后3天、之后4天、之后5天、之后6天、之后7天、之后8天、之后9天、之后10天、之后11天、之后12天、之后13天、之后14天、之后15天、之后16天、之后17天、之后18天、之后19天、之后20天、之后21天、之后22天、之后23天、之后24天、之后25天、之后26天、之后27天、之后28天、之后29天或之后30天开始。在某些实施方案中,雷帕霉素施用至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或至少12个月。在某些实施方案中,雷帕霉素分1、2、3、4或5个日剂量施用。

[0297] 在某些实施方案中,雷帕霉素的第一剂量是负荷剂量并且可以高于后续日剂量。在某些实施方案中,第一剂量可以是1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/

kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、1-4mg/kg、2-6mg/kg、4-8mg/kg、6-10mg/kg或8-12mg/kg。在某些实施方案中,日剂量可以是0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、2.5mg/kg、3mg/kg、3.5mg/kg、4mg/kg、1-3mg/kg或1.5-2.5mg/kg。在一个具体实施方案中,雷帕霉素以6mg/kg的初始剂量施用,接着是2mg/kg的日剂量。在一个具体实施方案中,雷帕霉素口服施用。

[0298] 在某些实施方案中,雷帕霉素可以足够的剂量施用于受试者以获得1-5ng/ml、2-10ng/ml、4-12ng/ml、6-14ng/ml、8-16ng/ml、10-18ng/ml、12-20ng/ml、14-22ng/ml或16-24ng/ml的目标全血水平。在一个具体实施方案中,目标全血水平可以是4-12ng/ml。

[0299] 在某些实施方案中,雷帕霉素可以本领域已知的便利方式施用于受试者,包括皮下、静脉内、血管内、局部、动脉内、颅内、肌肉内、口服、眶内、通过吸入、经皮、腹膜内,或通过允许在受试者体内发生雷帕霉素的适当作用的施用途径。在一个具体实施方案中,雷帕霉素口服施用。

[0300] 在某些实施方案中,mTOR抑制剂可以是依维莫司。在某些实施方案中,依维莫司每天施用两次。在某些实施方案中,依维莫司的施用可以在移植后立即开始,在受试者被诊断患有免疫相关疾病或病症之后,在受试者开始用抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂治疗之后,或者在器官或组织移植之后1天、之后2天、之后3天、之后4天、之后5天、之后6天、之后7天、之后8天、之后9天、之后10天、之后11天、之后12天、之后13天、之后14天、之后15天、之后16天、之后17天、之后18天、之后19天、之后20天、之后21天、之后22天、之后23天、之后24天、之后25天、之后26天、之后27天、之后28天、之后29天或之后30天开始。在某些实施方案中,依维莫司施用至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或至少12个月。

[0301] 在某些实施方案中,施用的依维莫司的剂量范围可以是0.25mg/kg/剂、0.5mg/kg/剂、0.75mg/kg/剂、1.0mg/kg/剂、1.25mg/kg/剂、1.5mg/kg/剂、1.75mg/kg/剂、2.0mg/kg/剂、0.25-0.5mg/kg/剂、0.5-0.75mg/kg/剂、0.75-1.0mg/kg/剂、1.0-1.25mg/kg/剂、1.25-1.50mg/kg/剂、1.50-1.75mg/kg/剂或1.75-2.0mg/kg/剂。在一个具体实施方案中,依维莫司以0.75-1.0mg/kg/剂的剂量范围每天施用两次。在一个具体实施方案中,依维莫司口服施用。

[0302] 在某些实施方案中,依维莫司可以足够的剂量施用于受试者以获得0.1-5ng/ml、1-6ng/ml、2-7ng/ml、3-8ng/ml、4-9ng/ml、5-10ng/ml、6-11ng/ml、7-12ng/ml或8-13ng/ml的目标全血水平。在一个具体实施方案中,目标全血水平可以是3-8ng/ml。

[0303] 在某些实施方案中,mTOR抑制剂可以是替西罗莫司、依维莫司、西罗莫司(雷帕霉素)、地磷莫司(ridaforolimus)、非雷帕霉素类似物mTOR抑制化合物,包括但不限于LY294002、渥曼青霉素、槲皮素、杨梅酮(myricentin)、星孢菌素(staurosporine)或ATP竞争抑制剂。在一些实施方案中,mTOR抑制剂在抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂施用于受试者之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,mTOR抑制剂在抗CD2抗体或其抗原结合片段施用于受试者之前、期间或之后施用。在一些实施方案中,mTOR抑制剂在CTLA-4共刺激阻滞剂施用于受试者之前、期间或之后施用。

[0304] 5.4 药物组合物

[0305] 本文提供了包含药学有效量的如本文所述的CD2结合分子的药物组合物。本文还提供了包含药学有效量的如本文所述的抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂的药物组合物。在某些实施方案中,本文所述的药物组合物可以配制用于皮下、静脉内、血管内、局部、关节内、动脉内、颅内、肌肉内、口服、眶内、吸入、腹膜内、骨内、气管内、舌下、口腔、直肠、皮内、鞘内、髓内或透皮施用途径。在一个具体实施方案中,包含本文所述的CD2结合分子的组合物被配制用于静脉内施用。在一个具体实施方案中,包含本文所述的CD2结合分子的组合物被配制用于皮下施用。在一个具体实施方案中,包含本文所述的抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂的组合物被配制用于静脉内施用。在一个具体实施方案中,包含本文所述的抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂的组合物被配制用于皮下施用。

[0306] 在某些实施方案中,配制用于静脉内或皮下施用的组合物可以是溶液、悬浮液或乳液。在某些实施方案中,可通过将本文所述的CD2结合分子与药学上适当的媒介物组合将本文所述的CD2结合分子配制成用于静脉内或皮下施用。在某些实施方案中,可以通过将本文所述的抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂与药学上适当的媒介物组合将本文所述的抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂配制成用于静脉内或皮下施用。在某些实施方案中,使用的媒介物可以是但不限于水、盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、葡萄糖溶液、甘油、乙醇、1-10%人血清白蛋白、5%葡萄糖水溶液、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砜、N,N-二甲基乙酰胺、丙二醇、聚乙二醇400、二乙二醇单乙醚、吐温(TWEEN)80、吐温20、聚氧乙烯-35蓖麻油、聚氧乙烯40氢化蓖麻油、辛酸癸酸聚乙二醇-8-甘油酯、大豆油、聚氧乙烯化油酸甘油酯和中链甘油单酯和甘油二酯。在某些实施方案中,脂质体和非水性媒介物诸如不挥发性油也可用于施用本文所述的CD2结合分子。在某些实施方案中,脂质体和非水性媒介物诸如不挥发性油也可用于施用本文所述的抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂。

[0307] 在某些实施方案中,媒介物可以含有维持等渗性的添加剂(例如,氯化钠、甘露醇)。在某些实施方案中,媒介物可以含有添加剂以维持化学稳定性。这些添加剂可以包括但不限于缓冲剂(例如马来酸、酒石酸、乳酸、柠檬酸、乙酸、碳酸氢钠和磷酸钠)和防腐剂(例如洗涤剂、氧化剂和离子缓冲剂)。所得药物制剂通过已知或合适的技术灭菌。

[0308] 在某些实施方案中,包含本文所述的CD2结合分子的组合物的静脉内施用可以作为推注、缓慢静脉内注射或连续静脉内输注施用。在某些实施方案中,包含本文所述的CD2结合分子的组合物的皮下施用可以作为推注施用。在某些实施方案中,包含本文所述的抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂的组合物的静脉内施用可以作为推注、缓慢静脉内注射或连续静脉内输注施用。在某些实施方案中,包含本文所述的抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂的组合物的皮下施用可以作为推注施用。

[0309] 5.5 试剂盒

[0310] 本文提供了一种试剂盒,其包含容纳在一个或多个容器中的本文所述的药物组合物。本文提供了含有如本文所述的抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂或其组合物,以及任选另一种活性剂的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包含容纳在一个或多个容器中的本文所述的药物组合物。在一些实施方案中,试剂盒包括本公开的至少一

种抗CD2抗体或其抗原结合片段或其组合物。在一些实施方案中,试剂盒包括在相同或不同容器中的本公开的一种或多种抗CD2抗体或其抗原结合片段或其组合物。在一些实施方案中,试剂盒包括本公开的至少一种CTLA-4共刺激阻滞剂。在一些实施方案中,试剂盒包括在相同或不同容器中的本公开的一种或多种CTLA-4共刺激阻滞剂或其组合物。在一些实施方案中,试剂盒包括在相同或不同容器中的至少一种抗CD2抗体或其抗原结合片段和至少一种CTLA-4共刺激阻滞剂。在一些实施方案中,试剂盒含有抗CD2抗体或其抗原结合片段的文库和/或CTLA-4共刺激阻滞剂的文库。在一些实施方案中,试剂盒包括另一种活性剂或另一种免疫抑制剂。在一些实施方案中,试剂盒包括对照和/或参考抗体。在一些实施方案中,试剂盒还可以包括产生和/或合成本文所述的化合物和/或组合物的试剂和/或说明。在一些实施方案中,试剂盒还可以包括一种或多种缓冲剂。在一些实施方案中,试剂盒包括在相同或不同容器中的另一种药剂(例如,另一种活性剂)或第三种药剂(例如,来自5.3节的药剂)。在一些实施方案中,提供具有抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂的容器用于单剂量施用或多剂量施用。在一些实施方案中,抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂以对于多个剂量、多次使用或多次施用足够的量存在于试剂盒中的容器中。在一些实施方案中,试剂盒包括施用抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂所必需的其他组分(例如,试剂盒包括注射器、导管、插管、泵或任何注射装置)。在某些实施方案中,试剂盒包含可用于施用本文所述的药物组合物的装置,包括但不限于注射器、无针注入器、滴袋、灌注泵、泵、贴片和吸入器。在一些实施方案中,试剂盒在与装有抗CD2抗体或其抗原结合片段和/或CTLA-4共刺激阻滞剂中的一种或多种的容器相同或单独的容器中包括药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂和/或缓冲剂。

[0311] 试剂盒的组分可处于单独的容器中或者可合并单个容器中。在一些实施方案中,试剂盒组分可以呈水性介质、粉末形式、晶体形式或冻干形式包装。药物组合物可包装在其中的容器可以包括但不限于瓶、包、安瓿、管、吸入器、袋、小瓶和容器。试剂盒的容器装置可包括组分可以置于其中的小瓶、试管、烧瓶、瓶、无针注入器、滴袋、灌注泵、泵、贴片、吸入器、安瓿、注射器或其他容器装置中的至少一种。在一些实施方案中,将组分适当地等分。在存在一种以上试剂盒组分的情况下,试剂和相应的标签可以包装在一起。在一些实施方案中,试剂盒含有第二容器、第三容器或其他附加容器,附加组分可单独置于其中。在一些实施方案中,试剂盒包括用于容纳无菌的药学上可接受的缓冲剂和/或其他稀释剂的第二容器装置。在一些实施方案中,在一个或多个小瓶中包括组分的各种组合。在一些实施方案中,试剂盒包括严格限制用于商业销售的用于容纳本公开的抗体和/或化合物和/或组合物的装置。此类容器可包括将所需小瓶保持在其中的注塑成型或吹塑成型的塑料容器。

[0312] 在一些实施方案中,试剂盒组分以一种和/或多种液体溶液形式提供。在一些实施方案中,液体溶液是水溶液或无菌水溶液。在一些实施方案中,试剂盒组分以干粉形式提供。当试剂和/或组分以干粉形式提供,此类粉末可通过添加合适体积的溶剂进行重构。在一些实施方案中,溶剂在另一个容器装置中提供。在一些实施方案中,标记染料以干粉形式提供。在一些实施方案中,标记染料以约、至少约或至多约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800、900、1000微克的量提供。在一些实施方案中,染料可重悬于任何合适的溶剂,诸如DMSO中。

[0313] 在一些实施方案中,试剂盒包括使用试剂盒组分的说明。在一些实施方案中,试剂

盒含有与剂量、施用、应用、储存条件、可通过使用一种或多种试剂盒组分治疗或预防的疾病列表和/或组分的使用相关的说明。在一些实施方案中,说明记录在合适的记录介质上。例如,说明可以印刷在基材,诸如纸、标签(例如,粘性标签)或塑料上。在一些实施方案中,说明作为包装插页存在于试剂盒中或存在于附在容器或试剂盒组分的标签上。在一些实施方案中,说明作为存在于合适的计算机可读存储介质例如CD-ROM、磁盘、USB存储设备或闪存驱动器上的电子存储数据文件提供。在一些实施方案中,说明不存在于试剂盒中但存在于远程来源中,例如经由因特网。

[0314] 5.6结局评估

[0315] 下文第6节描述了评估本文所述的方法的结局的示例性方法。

[0316] 在某些实施方案中,可通过确定生物样品中的细胞增殖、T细胞活化、CD2水平和/或同种免疫应答来评估本文所述的治疗方法的功效。在某些实施方案中,本文所述的治疗方法的功效可以通过技术人员已知的任何合适的测定或方法来评估,例如通过使用体外人T细胞增殖测定或混合淋巴细胞反应(MLR)测定。

[0317] 在某些实施方案中,本文所述的治疗方法的功效可通过确定移植的移植物(例如,肝脏或肾脏)的存活来评估。在某些实施方案中,可以对移植的移植物(例如,肝脏或肾脏)进行活检以检查移植的器官(例如,肝脏或肾脏)的健康状况并确定耐受性的诱导或移植物排斥的证据。可以使用常规光学显微镜术、免疫荧光和电子显微镜术检查组织活检。

[0318] 在某些实施方案中,本文所述的治疗方法的功效可通过检测受者中经治疗的经活检证实的急性排斥(tBPAR)来确定。在具体实施方案中,在移植后10个月、12个月、15个月、18个月、20个月、25个月、30个月、35个月、40个月、45个月、50个月、55个月或60个月时未在受者中检测到tBPAR。

[0319] 在某些实施方案中,移植手术结局的评估可包括监测受者中移植的器官(例如,肝脏或肾脏)的功能。例如,可以通过在移植后1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7.5个月、9个月、10.5个月、12个月、13.5个月、15个月、16.5个月、18个月、19.5个月、21个月、22.5个月、24个月、27个月、30个月、36个月、42个月、48个月或54个月,或在移植后1-5个月、5-10个月、10-15个月、15-20个月、20-25个月、25-30个月、30-35个月、35-40个月、40-45个月、45-50个月、50-55个月或55-60个月时测量器官功能来评估本文所述的治疗方法的功效。肝功能可以例如通过进行肝功能测试来确定,诸如测量丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)、血清胆红素、凝血酶原时间(PT)、国际标准化比率(INR)和/或白蛋白。在特定实施方案中,本文所述的治疗方法引起受者在移植后的至少10个月、至少15个月、至少20个月、至少25个月、至少30个月、至少35个月、至少40个月、至少45个月、至少50个月、至少55个月或至少60个月具有正常的器官功能(如通过器官功能测试确定的)。在特定实施方案中,本文所述的治疗方法引起受者与接受器官移植后标准护理疗法的患者相比,在移植后的至少10个月、至少15个月、至少20个月、至少25个月、至少30个月、至少35个月、至少40个月、至少45个月、至少50个月、至少55个月或至少60个月具有更好的器官功能(如通过器官功能测试确定的)。

[0320] 在具体实施方案中,本文所述的治疗方法引起受者在移植后的至少10个月、至少15个月、至少20个月、至少25个月、至少30个月、至少35个月、至少40个月、至少45个月、至少50个月、至少55个月或至少60个月具有5-60U/L、7-55U/L、10-55U/L、15-50U/L、20-40U/L或

25-35U/L的ALT值。

[0321] 在具体实施方案中,本文所述的治疗方法引起受者在移植后的至少10个月、至少15个月、至少20个月、至少25个月、至少30个月、至少35个月、至少40个月、至少45个月、至少50个月、至少55个月或至少60个月具有5-50U/L、8-48U/L、10-45U/L、15-40U/L或20-30U/L的AST值。

[0322] 在具体实施方案中,本文所述的治疗方法引起受者在移植后的至少10个月、至少15个月、至少20个月、至少25个月、至少30个月、至少35个月、至少40个月、至少45个月、至少50个月、至少55个月或至少60个月具有30-150U/L、40-129U/L、50-120U/L、60-110U/L、70-100U/L或80-90U/L的ALP值。

[0323] 在具体实施方案中,本文所述的治疗方法引起受者在移植后的至少10个月、至少15个月、至少20个月、至少25个月、至少30个月、至少35个月、至少40个月、至少45个月、至少50个月、至少55个月或至少60个月具有5-70U/L、8-61U/L、10-50U/L、15-45U/L、20-40U/L或25-35U/L的GGT值。

[0324] 在具体实施方案中,本文所述的治疗方法引起受者在移植后的至少10个月、至少15个月、至少20个月、至少25个月、至少30个月、至少35个月、至少40个月、至少45个月、至少50个月、至少55个月或至少60个月具有0.05-2mg/dL、0.1-1.5mg/dL、0.1-1.2mg/dL、0.5-1mg/dL或0.7-1mg/dL的血清胆红素值。

[0325] 在具体实施方案中,本文所述的治疗方法引起受者在移植后的至少10个月、至少15个月、至少20个月、至少25个月、至少30个月、至少35个月、至少40个月、至少45个月、至少50个月、至少55个月或至少60个月具有7-15秒、8-14秒、9-13秒、9.4-12.5秒或10-12秒的PT。

[0326] 在具体实施方案中,本文所述的治疗方法引起受者在移植后的至少10个月、至少15个月、至少20个月、至少25个月、至少30个月、至少35个月、至少40个月、至少45个月、至少50个月、至少55个月或至少60个月具有2-6g/dL、2.5-5.5g/dL、3-5g/Dl、3.5-5g/dL或4-4.5g/dL的白蛋白值。

[0327] 在具体实施方案中,本文所述的治疗方法引起受者在移植后的至少10个月、至少15个月、至少20个月、至少25个月、至少30个月、至少35个月、至少40个月、至少45个月、至少50个月、至少55个月或至少60个月具有INR 1-3、1.5-2.5、1.5-2或低于1.1。

[0328] 例如,可以通过在移植后10个月、15个月、20个月、25个月、30个月、35个月、40个月、45个月、50个月、55个月或60个月时测量肾功能来评估本文所述的治疗方法的功效。肾功能可以例如通过测量血清肌酐和/或肾小球滤过率来确定。在特定实施方案中,本文所述的方法可以引起受者具有正常的肾功能(如通过血清肌酐和/或肾小球滤过率(GFR)确定的)。在特定实施方案中,本文所述的方法可以引起受者与接受肝移植后标准护理疗法的患者相比具有更好的肾功能(如通过血清肌酐和/或肾小球滤过率确定的)。

[0329] 在具体实施方案中,本文所述的治疗方法引起受者在移植后的至少10个月、至少15个月、至少20个月、至少25个月、至少30个月、至少35个月、至少40个月、至少45个月、至少50个月、至少55个月或至少60个月具有0.5-1.5mg/mL、0.6-1.4mg/mL、0.7-1.3mg/mL、0.8-1.2mg/mL或0.9-1.1mg/mL的血清肌酐值。

[0330] 在具体实施方案中,本文所述的治疗方法引起受者在移植后的至少10个月、至少

15个月、至少20个月、至少25个月、至少30个月、至少35个月、至少40个月、至少45个月、至少50个月、至少55个月或至少60个月具有40-90、45-85、50-80、55-75、60-70或高于90的GFR。

[0331] 在某些实施方案中,移植手术结局的其他评估可以包括监测感染发生率、机会性感染发生率、任何治疗相关的不良事件的发生以及患者的移植后生活质量。在某些实施方案中,本文所述的治疗方法的功效可由受者对免疫抑制疗法的需求来确定。在特定实施方案中,本文所述的治疗方法引起在移植后10个月、15个月、20个月、25个月、30个月、35个月、40个月、45个月、50个月、55个月或60个月内不需要免疫抑制疗法。

[0332] 在某些实施方案中,功能测定可用于检测预测移植排斥的生物标志物,包括可通过ELISA确定的受者血清中循环的供体特异性抗体(DSA)的存在。在某些实施方案中,可以对循环淋巴细胞进行流式细胞术分析以确定受者的免疫系统重建状态。在某些实施方案中,可以进行受者外周血单个核细胞的混合淋巴细胞反应(MLR)以评估受者细胞对供体细胞的应答以及在移植手术后应答是否变化。

[0333] 在某些实施方案中,功能测定可用于确定是否实现了对移植的器官(例如,肝脏或肾脏)的耐受性的诱导。这些测定可包括流式细胞术分析以确定FoxP3⁺T细胞:CD4⁺T细胞比率,作为调控性T细胞存在的指标。

[0334] 5.7等效方案并通过引用并入

[0335] 本发明的范围不受本文所述的具体实施方案的限制。应当理解,功能等效的变型在本发明的范围内。实际上,根据前面的描述和附图,除本文示出和描述的那些以外对本发明的各种修改对于本领域的技术人员将变得显而易见。此类修改旨在落入所附权利要求书的范围内。本领域技术人员仅仅使用常规试验将认识到或者能够确定本文所描述的发明的具体实施方案的很多等效方案。此类等效方案旨在被下列权利要求涵盖。本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均在本文通过引用并入说明书中,其程度如同每个单独出版物、专利或专利申请被具体地和单独地指示通过引用整体并入本文一样。

[0336] 6. 实施例

[0337] 6.1 方法

[0338] 6.1.1 Fc γ R I、II和III亲和力的报告子测定:

[0339] 为了确定Fc γ 受体(Fc γ R)亲和力,将RT-CD2和RH-CD2的6倍连续稀释液与用人Fc γ RI、Fc γ RIIA-H或Fc γ RIIIA-V和荧光素酶报告基因(Promega)稳定转染的报告细胞一起孵育。如果报告细胞以其各自的Fc γ R与靶结合的IgG抗体的Fc片段结合,则会触发荧光素酶报告基因表达。报告细胞来自人Jurkat CD2⁺急性T细胞白血病细胞系。由于抗体对报告细胞具有亲和力,因此它们可以在测定中充当靶标和报告子。西利珠单抗、CD2结合分子1、西利珠单抗Fc片段或Fab片段以0.0001-10 μ g/mL的几种浓度添加。根据制造商的说明,使用FragIT试剂盒(Genovis)获得西利珠单抗Fab或Fc片段,它们作为完整的IgG等效物添加。在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下孵育23小时后,添加Bio-Glo荧光素酶测定试剂(Promega),并且在室温下避光孵育10-15分钟后使用Synergy HTX多模式读板仪(Synergy HTX Multi-mode plate reader, BioTek)测量发光。将发光值归一化至用最高浓度的阳性对照获得的发光信号。每次运行含有每种抗体的一式三份连续稀释液。

[0340] 6.1.2 基于流式细胞术的补体活化测定:

[0341] 为了评估补体依赖性细胞裂解(CDC),将Ficoll密度梯度离心分离的PBMC与西利

珠单抗或CD2结合分子在10%超低IgG FBS(Gibco)中的10x连续稀释液一起在PBS中在室温下振荡孵育。随后,添加等体积的复溶兔补体(InnoTrain),接着在室温下振荡孵育60分钟。将PBMC在PBS中洗涤并用7-AAD(Life Technologies)、抗CD56 BV421(BD,克隆NCAM16.2)、抗CD89 PE(Miltenyi,克隆REA234)、抗CD3 APC和抗CD19 APC-H7(BD;克隆SJ25C1)染色。将样品在冰上孵育并避光,直到使用FACSVerse流式细胞仪(BD Biosciences)进行样品采集。使用FlowJo软件(FlowJo LLC,Ashland)和GraphPad Prism 8(GraphPad Software)进行样品处理和数据分析。

[0342] 6.1.3混合淋巴细胞反应(MLR):

[0343] 经由Ficoll®Paque Plus(GE Healthcare)密度梯度离心从血沉棕黄层中分离外周血单个核细胞(PBMC)。血沉棕黄层是经由乌普萨拉大学医院(Uppsala University Hospital)血库从健康供体获得的,并且在采血24小时内进行PBMC分离。

[0344] 将来自两个供体的PBMC混合在PBS中,浓度为 1.5×10^7 个细胞/mL,并且用紫色增殖染料450(VPD450;BD Biosciences)根据制造商的说明染色。随后,将染色的PBMC洗涤并重悬于在分别补充有50IU/mL链霉素和青霉素的RPMI-1640(ATCC修饰;Gibco)的10%热灭活胎牛血清(FBS)中。将重悬的PBMC分配到圆底96孔组织培养基和纯培养基中(未处理的对照),添加稀释于细胞培养基中的西利珠单抗、CD2结合分子1或西利珠单抗Fab片段(0.01-50 μ g/mL)至最终浓度为 2×10^6 个细胞/mL(最终体积200 μ L;每种情况一式四份)。随后将PBMC培养物在37 $^{\circ}$ C、5%O₂、95%CO₂下孵育长达7天。对于NK细胞实验,使用10 μ g/mL的浓度。对于活化、增殖和免疫调控,使用0.01、0.1、1、10和50 μ g/mL的浓度。

[0345] 6.1.4 NK细胞分析:

[0346] 将意在用于分析NK细胞活化的样品用抗CD16 FITC(克隆3G8)、抗CD56PE(Miltenyi;克隆REA196)、抗CD3 PerCP-Cy5.5(克隆SP34-2)、抗CD69 APC(克隆FN50)和抗CD14 APC-H7(克隆M ϕ P-9)染色。

[0347] 将样品在4 $^{\circ}$ C下避光染色30分钟。如无另外指示,所有抗体均购自BD Biosciences。染色后,使用具有三激光设置(405nm、488nm、640nm)的FACSVerse流式细胞仪(BD Biosciences)采集样品。在基线(第0天)以及第1、2、4天经由流式细胞术对样品进行表型分析。使用VPD450(VPD450^高:未增殖的;VPD450^低:增殖的)评估细胞增殖。将NK细胞鉴定为CD3-CD14-CD56+和/或CD16+淋巴细胞。使用FlowJo®软件(FlowJo LLC,Ashland)进行采集后编辑和数据分析。

[0348] 6.1.5活化、增殖和免疫调控的分析:

[0349] 如以上所详述,进行PBMC分离和双向MLR设置。在7天后进行收获。将细胞用抗CD4 FITC、抗CD127 PerCP-Cy5.5和抗CD25 PE进行表面染色,然后使用FoxP3染色试剂盒,根据制造商的说明(BD Biosciences)进行固定和透化,以用抗FoxP3 Alexa 647(克隆236A/E7)染色。使用VDP450(VDP450^高:未增殖的;VDP450^低:增殖的)评估细胞增殖。将调控性T细胞(Treg)鉴定为CD4+、CD127^低、CD25^高和FoxP3+。将活化的细胞鉴定为CD4+和CD25^高。使用FlowJo®软件(FlowJo LLC,Ashland)进行采集后编辑和数据分析。

[0350] 6.1.6 Fc沉默抗CD2抗体的生成

[0351] 西利珠单抗(人源化抗CD2 IgG1 κ)是一种研究药物,并由制造商(ITB-Med, Stockholm, Sweden)提供。CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)是使用

GlycINATOR® (EndoS2; Genovis#A0-GL1-020) 根据制造商的说明书 (Genovis AB, Lund, Sweden) 生产的。

[0352] Fc沉默 (FcS) 抗CD2 mAb是经由将氨基酸取代引入西利珠单抗或标准IgG2/IgG4框架的序列中生成的。所有Fc沉默抗体都具有相同的轻链和互补决定区,并由Wuxi Biologics Limited (Wuxi, China) 生产。将每种抗体的基因序列克隆到质粒中,接着在中国仓鼠卵巢 (CHO-K1) 细胞中进行瞬时转染并产生。将抗CD2 mAb使用蛋白A和IEX/SEC柱纯化到至少95%的纯度和低于1EU/mg的内毒素水平。Fc沉默西利珠单抗 (CD2结合分子2; FcS抗CD2 IgG1) 是通过将众所周知的LALA-PG突变引入西利珠单抗中的等效位点而生成的 (Arduin等人2017, Lo等人2017)。FcS抗CD2 IgG2 (CD2结合分子3) 是通过在标准IgG2框架中的等效位点处引入以下突变生成的: V234A、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S、P331S (Wang等人2018)。FcS抗CD2 IgG4 (CD2结合分子4) 是通过在标准IgG4框架中的等效位点处引入以下突变生成的: S228P、L235E、P329G (Silva等人2015, Schlothauer等人2016)。

[0353] 6.1.7 表面等离子共振 (SPR) CD2结合

[0354] 使用Biacore T200仪器 (Cytiva Life Sciences/Biacore, Uppsala, Sweden) 进行相互作用实验。使用标准胺偶联和CM5生物传感器芯片 (Cytiva Life Sciences/Biacore, Uppsala, Sweden), 用10mM HEPES缓冲剂 (pH 7.4)、150mM NaCl、0.5mM EDTA、0.05%吐温20运行缓冲剂将IgG固定到200-1300RU的表面密度。每个抗体至少固定两次。

[0355] 所有相互作用实验均在25℃下进行。重组截短的人CD2 (Sino Biological, Beijing, China) 以两倍稀释系列稀释, 最高浓度为5nM, 并在固定的IgG上注射180秒。解离15分钟后, 通过30秒注射10mM甘氨酸 (pH 1.7) 使传感器芯片再生。在数据分析之前, 将参考表面和空白注射的传感图从原始数据中减去。使用T200评价软件v3.0 (Cytiva Life Sciences/Biacore, Uppsala, Sweden) 将两态 (诱导拟合) 相互作用模型拟合为数据以确定动力学速率常数和亲和力。

[0356] 6.1.8 SPR FcγR结合

[0357] 通过胺偶联将重组截短的人CD2 (Sino Biological, Beijing, China) 共价固定到CM5生物传感器芯片 (Cytiva Life Sciences/Biacore, Uppsala, Sweden)。IgG被捕获到胺偶联的CD2上。所有实验都使用Biacore T200™仪器 (Cytiva Life Sciences/Biacore, Uppsala, Sweden) 在25℃下进行。化合物相互作用的表征在pH 7.4的含150mM NaCl、0.5mM EDTA、0.05%吐温20的10mM HEPES中进行。在多循环或单循环实验中在CD2捕获的IgG上注射Fcγ受体 (R&D systems, Minneapolis USA) 120秒, 浓度系列高达0.5μM。FcγRIIA的R131同种型和FcγRIIIA的V176同种型用于所有实验。CD2表面通过120秒注射50mM NaOH再生。在使用1:1相互作用模型或非均相结合模型进行全局分析之前, 对传感图进行双重参考 (参考表面、空白)。对于与快速解离的较弱相互作用, 使用Langmuir等温线和线性项 (补偿非特异性相互作用) 之和, 通过稳态分析来确定亲和力。确定动力学参数为基于2-3次重复实验系列的平均值。

[0358] 6.1.9 基于细胞的FcγR信号传导测定

[0359] 分别用FcγRI、FcγRIIA或FcγRIIIA转染的Jurkat报告细胞系 (Promega Corp., Madison, Wisconsin USA) 与每种抗体剂的连续稀释液一起孵育23小时。靶结合的抗体通过相应的FcγR的结合诱导报告细胞中荧光素酶的表达。在37℃、5%CO2下孵育23小时后经由

添加荧光素酶测定底物(Promega Corp.,Madison,Wisconsin USA)并使用Synergy HTX多功能读板仪(BioTek,Winooski,Vermont USA)测量发光来检测荧光素酶表达。

[0360] 6.1.10外周血单个核细胞的分离

[0361] 经由Ficoll®Paque Plus(Cytiva Life Sciences,Uppsala,Sweden)密度梯度离心从血沉棕黄层中分离外周血单个核细胞(PBMC)。血沉棕黄层是经由乌普萨拉大学医院血库(Uppsala University Hospital blood bank,Uppsala,Sweden)以及卡罗林斯卡大学医院血库(Karolinska University Hospital blood bank,Stockholm,Sweden)从健康供体获得的,并且在采血24小时内进行PBMC分离。

[0362] 6.1.11CD2表达分析

[0363] 将静息PBMC染色并分析靶抗原表达。随后,自体培养物中的PBMC经由CD28/CD3珠粒(Miltenyi,Bergisch Gladbach,Germany;珠粒:细胞比率5:1)活化48小时并且在补充有50U/mL链霉素和青霉素(Gibco,Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,USA)的RPMI-1640ATCC Mod.中的10%热灭活胎牛血清(FBS;Gibco,Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,USA)中培养并且研究靶抗原表达。

[0364] 将PBMC在盐水溶液中洗涤两次。将样品与Fc受体结合抑制剂(Invitrogen;Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,USA)一起孵育,然后在FBS染色缓冲液(BD BioSciences, San Diego, USA)中洗涤两次,然后与10µg/mL西利珠单抗一起孵育20分钟。去除未结合的抗体,之后用二次抗人IgG Fc BV421(Biolegend, San Diego, USA; Clone HP6017)染色。去除未结合的二抗,之后对T细胞亚群、调控性T细胞或B细胞和NK细胞进行表面染色。如无另外指示,下面列出的所有抗体均购自BD Biosciences(San Diego, USA)。

[0365] 用于分析T细胞亚群分布的样品用抗CD3 PerCP(克隆SK7)、抗CD4 FITC(克隆SK3)和抗CD8 PE(克隆SK1),用抗CCR7 Alexa647(克隆3D12)和抗CD45RA APC-H7(克隆HI100)(原初T细胞:CCR7+CD45RA+;中央记忆T细胞:CCR7+CD45RA-;效应记忆T细胞:CCR7-CD45RA-;终末分化效应记忆T细胞(Temra):CCR7-CD45RA+)进行染色。分析Treg的样品用抗CD4 FITC(克隆RPA-T4)、抗CD25 PE(克隆M-A251)、抗CD45RA APC-H7(克隆HI100)、抗CD127PerCP-Cy5.5(克隆HIL-7R-M21)和抗FoxP3 Alexa647(Clone 259D/C7)染色。使用BD Human FoxP3缓冲液组(BD BioSciences, San Diego, USA)根据供应商的方案对它们进行透化。将Treg鉴定为CD4+CD127-CD25+FoxP3+。

[0366] NK/B细胞组由抗CD16 FITC(克隆3G8)、抗CD56 PE(Miltenyi,Bergisch Gladbach,Germany;克隆REA196)、抗CD3 APC(克隆SK7)、抗CD14 APC-H7(克隆M5E2)和抗CD20 PerCP(克隆SJ25C1)组成。样品在4℃下在黑暗中染色,并使用FACSVerse流式细胞仪(BD Biosciences, San Diego, USA)进行采集。使用FlowJo® 10.5.3软件(FlowJo LLC, Ashland, USA)进行采集后编辑和数据分析。

[0367] 6.1.12FcγR表达分析

[0368] 使用NK细胞分离试剂盒(Miltenyi,Bergisch Gladbach,Germany)根据制造商的说明书经由负磁珠选择分离NK细胞。将一部分NK细胞在盐水溶液中洗涤两次并用抗CD56 BV421(克隆NACM16.2)、抗CD3 VioGreen(Miltenyi,Bergisch Gladbach,Germany;克隆REA613)、抗CD16 FITC(Miltenyi,Bergisch Gladbach,Germany;克隆REA423)、抗CD32 PE(Miltenyi,Bergisch Gladbach,Germany;克隆REA997)和抗CD64 APC(Miltenyi,Bergisch

Gladbach, Germany; 克隆 REA978) 染色。将样品在 4℃ 下在黑暗中染色, 并使用 FACSCelesta 流式细胞仪 (BD Biosciences, San Diego, USA) 进行采集。使用 FlowJo® 10.6.2 软件 (FlowJo LLC, Ashland, USA) 进行采集后编辑和数据分析。将 NK 细胞定义为 CD3⁻CD56⁺ 和/或 CD16⁺ 淋巴细胞。

[0369] 6.1.13 自体淋巴细胞培养 (ALC) 和混合淋巴细胞反应 (MLR)

[0370] 为了在西利珠单抗和 CD2 结合分子 1 (一种去糖基化的 CD2 结合分子) 的存在下分析随时间推移的 NK 细胞活化, 将来自每个供体的等量 PBMC 用紫色增殖染料 450 (BD Biosciences, San Diego, USA; VPD450) 染色。将细胞重悬于分别补充有 50U/mL 链霉素和青霉素 (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 的 RPMI-1640 ATCC Mod. 中的 10% 热灭活 FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 中。将重悬的 PBMC 分配到圆底 96 孔细胞培养板中并添加纯培养基 (无抗体对照) 或稀释在细胞培养基中的相应抗体剂中的一种 (10μg/mL) 至最终浓度为 2×10^6 个细胞/mL (最终体积 200μL)。然后将 ALC 和 MLR 在 37℃、5% CO₂ 下分别孵育一天、两天、四天和七天。每天, 将细胞在盐水溶液中洗涤两次并与 Fc 受体结合抑制剂 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 一起孵育, 接着用抗 CD16 FITC (克隆 3G8)、抗 CD56 PE (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany; 克隆 REA196)、抗 CD3 PerCP-Cy5.5 (克隆 SP34-2)、抗 CD69 APC (克隆 FN50) 和抗 CD14 APC-H7 (克隆 MφP-9) 染色。将 NK 细胞鉴定为 CD3⁻CD14⁻CD56⁺ 和/或 CD16⁺ 淋巴细胞。如无另外指示, 则所有流式细胞术抗体均购自 BD Biosciences (San Diego, USA)。将样品在 4℃ 下在黑暗中染色, 并使用 FACSVerse 流式细胞仪 (BD Biosciences, San Diego, USA) 进行采集。使用 FlowJo® 10.5.3 软件 (FlowJo LLC, Ashland, USA) 进行采集后编辑和数据分析。

[0371] 为了在不同抗 CD2 变体的存在下 7 天后分析 NK 细胞活化, 将来自每个供体的等量 PBMC 用 VPD450 染色用于另一个实验。将细胞重悬于分别补充有 50μg/mL 硫酸链霉素和 10μg/mL 硫酸庆大霉素 (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) 的 AIM-V 培养基中的 10% 热灭活 FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 中。将重悬的 PBMC 分配到圆底 96 孔细胞培养板中并添加纯培养基 (无抗体对照) 或稀释在细胞培养基中的相应抗体药剂中的一种 (10-0.0001μg/mL) 至最终浓度为 2×10^6 个细胞/mL (最终体积 200μL)。然后将 MLR 在 37℃、5% CO₂ 下分别孵育七天。在第五天向每个孔中添加新鲜培养基 (100μL)。在第 7 天, 将细胞在盐水溶液中洗涤两次并与 Fc 受体结合抑制剂 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 一起孵育, 接着用抗 CD3 VioGreen (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany; 克隆 REA613)、抗 CD45RA BV650 (克隆 HI100)、抗 CD69 BV786 (克隆 FN50)、抗 CD8 BB550 (克隆 RPA-T8)、抗 CD56 PE (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany; 克隆 REA196)、抗 CD2 PE-CF594 (Clone RPA-2.10; 注意: 该克隆结合与西利珠单抗不同的 CD2 表位)、抗 CCR7 APC (BioLegend, San Diego, USA; 克隆 G043H7) 和抗 CD4 APC-Vio770 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany; 克隆 REA623) 染色。将 NK 细胞鉴定为 CD3⁻CD56⁺ 淋巴细胞。其余颜色用于另一个实验。如无另外指示, 则所有流式细胞术抗体均购自 BD Biosciences (San Diego, USA)。将样品在 4℃ 下在黑暗中染色, 并使用 FACSCelesta 流式细胞仪 (BD Biosciences, San Diego, USA) 进行采集。使用 FlowJo® 10.6.2 软件 (FlowJo LLC, Ashland, USA) 进行采集后编辑和数据分析。

[0372] 6.1.14NK自相残杀

[0373] 使用NK细胞分离试剂盒 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) 经由负MACS选择从PBMC分离NK细胞。将NK细胞重悬于补充有50 μ g/mL硫酸链霉素和10 μ g/mL硫酸庆大霉素 (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) 以及500IU/mL人IL-2 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) 的AIM-V培养基中的10%热灭活FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 中, 并根据收率, 分配到圆底96孔细胞培养板中, 最终密度为1.25x 10⁶至2.0x 10⁶个NK细胞/mL。此外, 添加纯培养基(无抗体对照)或稀释在细胞培养基中的相应抗体药剂中的一种(最终浓度10-0.001 μ g/mL), 接着在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育过夜。随后, 将NK细胞在盐水溶液中洗涤, 接着与Fc受体结合抑制剂 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 一起孵育, 并用抗CD3 VioGreen (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany; 克隆REA613)、抗CD107a BV786 (BioLegend, San Diego, USA; 克隆H4A3)、抗CD16 FITC (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany; 克隆REA423)、抗CD56 PE (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany; 克隆REA196)、7-AAD (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 和抗CD69 APC (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany; 克隆REA824) 染色。将NK细胞鉴定为CD3-CD56+和/或CD16+淋巴细胞。将样品在4 $^{\circ}$ C下在黑暗中染色, 并使用FACSCelesta流式细胞仪 (BD Biosciences, San Diego, USA) 进行采集。使用FlowJo® 10.6.2软件 (FlowJo LLC, Ashland, USA) 进行采集后编辑和数据分析。

[0374] 6.1.15天然细胞毒性测定

[0375] 使用NK细胞分离试剂盒 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) 经由负MACS选择从PBMC分离NK细胞。对于短期预孵育的运行, 将NK细胞重悬于补充有50 μ g/mL硫酸链霉素和10 μ g/mL硫酸庆大霉素 (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) 的AIM-V培养基中的10%热灭活FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 中并分配到圆底96孔细胞培养板中, 接着在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下静置过夜。之后, 添加纯培养基(无抗体对照)或稀释于细胞培养基中的相应抗体剂中的一种(最终浓度10-0.001 μ g/mL), 接着在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育30分钟, 之后添加HLA I类阴性靶细胞 (SPI-801, DSMZ目录号ACC 86; 根据MACS分离的收率, NK细胞与靶细胞的比率介于1:1和1:2)。添加靶细胞后在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育2小时, 并且进行后续流式细胞术染色, 如NK自相残杀部分所述。

[0376] 对于NK细胞与抗体预孵育的运行, 将NK细胞重悬于补充有50 μ g/mL硫酸链霉素和10 μ g/mL硫酸庆大霉素 (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) 以及500IU/mL人IL-2 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) 的AIM-V培养基中的10%热灭活FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 中。此外, 添加纯培养基(无抗体对照)或稀释在细胞培养基中的相应抗体剂中的一种(最终浓度10-0.001 μ g/mL), 接着在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育两天。第二天, 添加HLA I类阴性靶细胞 (SPI-801; 根据MACS分离的收率, NK细胞与靶细胞的比率介于1:1至1:2之间), 接着在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育2小时并进行后续流式细胞术染色, 如NK自相残杀部分所述。

[0377] 6.1.16利妥昔单抗诱导的ADCC测定

[0378] 使用NK细胞分离试剂盒 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) 经由负MACS选择从PBMC分离NK细胞, 重悬于补充有50 μ g/mL硫酸链霉素和10 μ g/mL硫酸庆大霉素 (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) 的AIM-V培养基的10%热灭活FBS (Gibco,

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 中并分配到圆底96孔细胞培养板中。此外,添加纯培养基(无抗体对照)或稀释在细胞培养基中的相应抗CD2抗体剂中的一种(最终浓度10 μ g/mL),接着在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育过夜。第二天添加Daudi靶细胞(DSMZ目录号ACC 78;CD20⁺;NK与Daudi的比率为4:1)和利妥昔单抗(最终浓度0.0001-1 μ g/mL),接着在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育2小时。随后,将细胞在盐水溶液中洗涤并与Fc受体结合抑制剂(Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)一起孵育,接着用抗CD56 BV421 (BD Biosciences, San Diego, USA; 克隆NCAM16.2)、抗CD3 VioGreen (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany; 克隆REA613)、抗CD107a BV786 (BioLegend, San Diego, USA; 克隆H4A3)、抗CD16 FITC (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany; 克隆REA423)、抗CD2 PE-CF594 (BD Biosciences, San Diego, USA; 克隆RPA-2.10)、抗CD69 APC (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany; 克隆REA824) 和抗CD19 APC-H7 (BD Biosciences, San Diego, USA; 克隆SJ25C1) 染色。将NK细胞鉴定为CD3-CD56⁺和/或CD16⁺淋巴细胞。将样品在4 $^{\circ}$ C下在黑暗中染色,并使用FACSCelesta流式细胞仪 (BD Biosciences, San Diego, USA) 进行采集。使用FlowJo[®]10.6.2软件 (FlowJo LLC, Ashland, USA) 进行采集后编辑和数据分析。

[0379] 6.1.17图表和统计学分析

[0380] 使用GraphPad Prism 8软件(GraphPad Software, San Diego)进行结果的可视化和基础数据的统计分析。除非另有说明,否则使用重复测量单因素ANOVA,接着进行Dunnett多重比较检验或使用双因素ANOVA,接着进行Dunnett多重比较检验来分析数据。如果没有另外说明,则未处理的对照用作比较因子。

[0381] 6.2实施例1:CD2结合分子1对ADCC和免疫调节活性的影响

[0382] Fc γ 受体(Fc γ R) IIIA是ADCC活性的重要介质。将西利珠单抗和西利珠单抗片段对Fc γ RIIIA的亲合力与CD2结合分子1的Fc γ RIIIA受体亲合力进行比较。如图1所示,西利珠单抗对Fc γ RIIIA具有高亲合力,如通过荧光素酶报告基因表达的倍数增加所测量的。相反,西利珠单抗Fab片段、Fc片段和CD2结合分子1对Fc γ RIIIA未表现出任何亲合力(图1)。因为表达Fc γ RIIIA的细胞是ADCC的主要介质,没有Fc γ RIIIA结合和信号传导,所以被CD2结合分子1结合的表达CD2的细胞将不会经由ADCC被耗竭。

[0383] 虽然CD2结合分子1结合Fc γ RIIIA并因此介导ADCC的能力受到抑制,但CD2结合分子1调节免疫活性的能力得以维持。图2显示了CD2结合分子1对CD4⁺/CD25⁺T细胞的活化(图2A)和增殖(图2B)表现出与西利珠单抗相当的抑制作用。作为免疫调节活性的附加度量,CD2结合分子1显示出与西利珠单抗相当的诱导T调控细胞(Treg)表达的能力(图3)。

[0384] 6.3实施例2:CD2结合分子1对NK细胞的影响

[0385] 检查CD2结合分子1对NK细胞的影响。NK细胞是先天免疫系统的主要效应子并且通过其Fc γ RIIIA与免疫复合IgG结合。虽然CD2结合分子1对Fc γ RIIIA没有亲合力(如图1所见),但是CD2结合分子1仍然表现出对NK细胞的影响。图4说明了在自体(图4A)或同种异体(图4B)混合淋巴细胞反应(MLR)中,与西利珠单抗相比,CD2结合分子1对CD69⁺NK细胞的表达表现出抑制作用。

[0386] 6.4实施例3:CD2结合分子1对ADCP的影响

[0387] 在体内,表达Fc γ RIIA的细胞是抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的主要介质。检查CD2结合分子1对表达CD2的细胞的影响以确定CD2结合分子1对Fc γ RIIA的亲合力。图5示

出与西利珠单抗相比,CD2结合分子1诱导的Fc γ RIIA信号传导的缺乏。在没有Fc γ RIIA结合和信号传导的情况下,CD2结合分子1所结合的表达CD2的细胞将不太可能经由ADCP被耗竭。

[0388] 如通过抑制CD69+T细胞活化的能力所测量的,检查西利珠单抗Fab片段的免疫调节活性。虽然与对照相比,Fab片段不抑制CD69+T细胞的活化,但西利珠单抗和CD2结合分子1均显示出抑制活化的能力(图6)。尽管CD2结合分子1似乎比西利珠单抗更小程度地抑制CD69+T细胞活化,但重要的是,与Fab片段相比,CD2结合分子1保留了显著的免疫调节活性。总的来说,这些数据显示CD2结合分子1的ADCC活性被消除,而免疫调控活性得以维持。

[0389] 6.5实施例4:CD2结合分子的恒定区修饰的影响

[0390] 将使用抗体亚类支架和Fc修饰的各种组合来构建CD2结合分子。将测试所得CD2结合分子的ADCC活性和免疫调节作用。

[0391] 6.5.1 IgG1亚类CD2结合分子

[0392] CD2结合分子将由IgG1支架、与西利珠单抗的VH可变区100%同一的VH可变区、与西利珠单抗的VL可变区100%同一的VL可变区和与西利珠单抗的恒定区100%同一的恒定区构建而成,除了在N297处有点突变外。N297处的突变可包括但不限于N297G、N297Q和N297A。N297点突变将引起Fc缺乏糖基化和沉默。这种CD2结合分子的ADCC活性将在体外通过量化由于NFAT途径活化而产生的荧光素酶来确定。CD2结合分子的Fc区与在Jurkat细胞上稳定表达的Fc γ RIIIA的结合将发出驱动荧光素酶表达的NFAT活化应答信号。效应细胞中的荧光素酶活性将通过发光读数进行量化。这种CD2结合分子的免疫调节活性将在体外通过量化CD2分子活化在免疫应答调控中很重要的细胞亚群(包括CD69+T细胞、CD69+NK细胞和Treg)的能力来确定。细胞活化和增殖将使用混合淋巴细胞反应(MLR)测定来确定。

[0393] CD2结合分子将由IgG1支架、与西利珠单抗的VH可变区100%同一的VH可变区、与西利珠单抗的VL可变区100%同一的VL可变区和获自不同抗体的天然恒定区构建而成。该CD2结合分子的ADCC活性将如上所述在体外确定。该CD2结合分子的免疫调节活性将如上所述在体外确定。

[0394] CD2结合分子将由IgG1支架、与西利珠单抗的VH可变区100%同一的VH可变区、与西利珠单抗的VL可变区100%同一的VL可变区和获自不同抗体的天然恒定区构建而成,其中转换的恒定区在N297处具有点突变。N297处的突变可包括但不限于N297G、N297Q和N297A。N297点突变将引起Fc缺乏糖基化和沉默。该CD2结合分子的ADCC活性将如上所述在体外确定。该CD2结合分子的免疫调节活性将如上所述在体外确定。

[0395] 6.5.2 IgG2亚类CD2结合分子

[0396] 将产生IgG2 CD2结合分子并评价与IgG1 CD2结合分子相比的ADCC活性和免疫调节作用。

[0397] CD2结合分子将由IgG2支架、与西利珠单抗的VH可变区100%同一的VH可变区、与西利珠单抗的VL可变区100%同一的VL可变区和获自不同抗体的天然恒定区构建而成。该CD2结合分子的ADCC活性将如上所述在体外确定。该CD2结合分子的免疫调节活性将如上所述在体外确定。

[0398] CD2结合分子将由IgG2支架、与西利珠单抗的VH可变区100%同一的VH可变区、与西利珠单抗的VL可变区100%同一的VL可变区和获自不同抗体的天然恒定区构建而成,其

中转换的恒定区在N297处具有点突变。N297处的突变可包括但不限于N297G、N297Q和N297A。N297点突变将引起Fc缺乏糖基化和沉默。该CD2结合分子的ADCC活性将如上所述在体外确定。该CD2结合分子的免疫调节活性将如上所述在体外确定。

[0399] 6.5.3IgG4亚类CD2结合分子

[0400] 将产生IgG4 CD2结合分子并评价与IgG1 CD2结合分子相比的ADCC活性和免疫调节作用。

[0401] CD2结合分子将由IgG4支架、与西利珠单抗的VH可变区100%同一的VH可变区、与西利珠单抗的VL可变区100%同一的VL可变区和获自不同抗体的天然恒定区构建而成。该CD2结合分子的ADCC活性将如上所述在体外确定。该CD2结合分子的免疫调节活性将如上所述在体外确定。

[0402] CD2结合分子将由IgG4支架、与西利珠单抗的VH可变区100%同一的VH可变区、与西利珠单抗的VL可变区100%同一的VL可变区和获自不同抗体的天然恒定区构建而成，其中转换的恒定区在N297处具有点突变。N297处的突变可包括但不限于N297G、N297Q和N297A。N297点突变将引起Fc缺乏糖基化和沉默。该CD2结合分子的ADCC活性将如上所述在体外确定。该CD2结合分子的免疫调节活性将如上所述在体外确定。

[0403] 6.6实施例5：西利珠单抗通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性诱导NK细胞自相残杀

[0404] 6.6.1引言

[0405] 糖蛋白CD2(也称为LFA2)在T细胞和NK细胞上表达,在那里它用作粘附和活化受体(Binder等人2020a)。在人类中,CD2的主要结合伴侣是广泛表达的,尤其是在抗原呈递细胞(APC)上广泛表达的淋巴细胞相关抗原3(LFA3;也称为CD58)。西利珠单抗是一种单克隆抗CD2 IgG1抗体,目前正在进行移植领域的临床试验(ClinicalTrials.gov标识符:NCT04311632)。先前的证据显示,西利珠单抗在灵长类动物(Sellberg等人2020)和人类患者(O'Mahony等人2007)中诱导体内NK细胞耗竭。

[0406] NK细胞表达活化性受体和抑制性受体。通过两组受体的信号传导平衡得以整合并决定成熟NK细胞是保持静止状态还是变活化(Watzl 2014)。因此,NK细胞活化可以通过抑制信号传导的减少、活化信号传导的增加或两者的组合而引发。在活化性NK细胞受体中,CD16是一种其信号传导可以独立诱导NK细胞活化的受体。大多数其余活化性NK细胞受体需要共同活化以引发NK细胞活化。CD16a是一种低亲和力Fc γ 受体(Fc γ R)并且也称为Fc γ RIIIA。NK细胞经由CD16a与靶结合的IgG抗体结合,促进抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。其他活化性NK细胞受体包括NKG2D、某些杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)和NKp46,它们分别与肿瘤抗原、外来HLA和病毒蛋白结合。抑制性NK细胞受体中最突出的是识别自身HLA的KIR(Paul和La1 2017)。NK细胞的非抗体依赖性靶细胞杀伤通常称为自然或自发性NK细胞细胞毒性。

[0407] NK细胞细胞毒性之前的关键事件是经由细胞-细胞粘附分子进行稳定的靶细胞缀合(Orange等人2003)。一旦发生稳定的靶细胞缀合并形成了NK细胞免疫突触(NKIS),肌动蛋白细胞骨架重排就会继续进行,以促进将裂解性囊泡转运到NKIS并随后释放以实现靶细胞杀伤。参与NK靶细胞缀合和NKIS形成的粘附分子的实例是分别与靶细胞上的ICAM-1和LFA3结合的LFA-1(Paul和La1 2017)和CD2(Orange等人2003)。即使在自然NK细胞细胞毒性

中,CD16也通过与CD2的相互作用在NKIS中富集。废除CD2与CD16之间的这种相互作用会显著降低自然NK细胞细胞毒性,但不会影响NK介导的ADCC(Grier等人2012)。CD2有两个Ig结构域,一个膜远端结构域和一个膜近端结构域。类似于在T细胞-抗原呈递细胞(APC)缀合期间观察到的情况,CD2在NK细胞在靶细胞缀合后形成的免疫突触中积聚。

[0408] 在这里,表征了在混合淋巴细胞反应(MLR)和纯NK细胞培养中西利珠单抗对NK细胞活化的影响,并研究了CD2阻滞对自然细胞毒性和ADCC的影响。

[0409] 6.6.2CD2和Fc γ 受体结合

[0410] 抗CD2抗体与CD2的结合和Fc γ R结合经由表面等离子共振(SPR)进行表征。如表6所示,所有测试的抗体都展示出相似的CD2结合亲和力,亲和常数(KD)为约0.9-1.5nM。西利珠单抗结合Fc γ RI、Fc γ RIIA和Fc γ RIIIA。相反,CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)结合Fc γ RI,但不结合Fc γ RIIA和Fc γ RIIIA。所有三种Fc沉默抗CD2抗体(CD2结合分子2、3和4)均未展示出可检测的Fc γ R亲和力。

[0411] 表6:不同的抗CD2抗体对CD2和Fc γ 受体(Fc γ R)I、IIA和IIIA的亲和力

[0412]	KD ^(a) , nM	西利珠单抗	CD2结合分子1 ^(b)	CD2结合分子2 ^(c)	CD2结合分子3 ^(c)	CD2结合分子4 ^(c)
	CD2	1.2	1.2	1.5	0.9	1.4
	Fc γ RI	0.2	1.13	>2000	>2000	>2000
	Fc γ RIIA	579	>5000	>5000	>5000	>5000
	Fc γ RIIIA	131	>2000	>5000	>5000	>5000

[0413] 经由表面等离子体共振测量西利珠单抗、CD2结合分子1、CD2结合分子2、CD2结合分子3和CD2结合分子4对CD2、Fc γ RI、Fc γ RIIA和Fc γ RIIIA的KD。

[0414] ^(a) KD,亲和常数;^(b) 去糖基化的CD2结合分子;^(c) Fc沉默

[0415] 为了确认Fc γ R结合引起Fc γ R诱导的信号传导,在基于细胞的Fc γ R信号传导测定中测试了每种抗体(表7-9)。如图9所示,与SPR结果一致,西利珠单抗诱导通过Fc γ RI、Fc γ RIIA和Fc γ RIIIA的信号传导。相反,CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)仅诱导通过Fc γ RI的信号传导。Fc沉默的抗CD2变体均未诱导Fc γ R介导的信号传导。

[0416] 6.6.3NK细胞上的CD2和Fc γ R表达

[0417] 经由流式细胞术测量NK细胞上的CD2表达。如图10A所示,NK细胞往往具有比T细胞更低的CD2表达。虽然CD56^{bright} NK细胞以与平均T细胞相当的水平表达CD2,但是CD56^{dim}和CD56^{neg} CD16⁺ NK细胞以显著更低的水平表达CD2(分别p=0.0074和p=0.0111;重复测量单因素ANOVA,接着进行Dunnett多重比较检验;(表10))。然而,与CD2⁺细胞类型,如B细胞相比,NK细胞显示出显著的CD2表达。

[0418] 另外,在用抗CD3和抗CD28抗体缀合的微珠活化PBMC之前和之后测量T细胞和NK细胞上的CD2表达(表11)。如图10B所展示,在T细胞(p=0.0034)、CD56^{dim} NK细胞(p=0.0024)、CD56^{bright} NK细胞(p=0.017)和CD56⁺CD16⁺ NK细胞(p=0.0029;双尾配对t检验)上活化后CD2表达显著升高。

[0419] 如图11所示,几乎所有NK细胞(91.0%)都表达Fc γ RIIIA(CD16),而Fc γ RII表达是非均相的(19.2%,CD32)。NK细胞不表达Fc γ RI(数据未示出)。

[0420] 6.6.4在自体 and 混合淋巴细胞培养中CD2阻滞对抗体介导的和自然的NK细胞活化的影响

[0421] 为了研究西利珠单抗对NK细胞活化的影响,用饱和剂量的西利珠单抗进行自体淋巴细胞培养(ALC)和MLR。如图12所示,西利珠单抗使CD69⁺NK细胞的百分比(%CD69⁺Nk细胞)在一天($p < 0.0001$)和两天($p = 0.0001$)的MLR之后以及在一天的($p < 0.0001$)、两天($p < 0.0001$)、四天($p = 0.0006$)和七天($p = 0.0082$)的ALC之后显著增加(表12和13)。在MLR第四天和第七天,观察到未处理的对照(无抗体)中%CD69⁺NK细胞增加。这可能源自NK细胞对同种异体HLA的反应和/或来自其他供体的PBMC上不存在自身HLA。如图12所示,CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)使%CD69⁺NK细胞在四天($p = 0.0012$)和七天($p = 0.0035$)之后显著降低(重复测量双因素方差分析(two-way ANOVA),接着进行Dunnett多重比较检验)。添加CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)并未有意义地改变ALC中CD69⁺NK细胞的百分比。

[0422] 为了进一步表征MLR中NK细胞活化受CD2阻滞的抑制,进行0.0001至10 μ g/mL的剂量滴度并且在七天的MLR之后分析NK细胞上的CD69表达。将MLR与西利珠单抗、CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)、CD2结合分子2、CD2结合分子3或CD2结合分子4一起孵育。如图13A所展示,相对于未处理的对照(无抗体),0.1 μ g/mL($p = 0.0003$)、1 μ g/mL($p = 0.0018$)和10 μ g/mL($p = 0.0256$)剂量的西利珠单抗诱导%CD69⁺NK细胞显著增加。相反,CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)在1 μ g/mL($p = 0.0012$)和10 μ g/mL($p = 0.006$)下诱导%CD69⁺NK的显著降低。CD2结合分子2、3和4在0.1 μ g/mL(分别 $p = 0.0178$, $p = 0.0122$, $p = 0.0234$)、1 μ g/mL(分别 $p = 0.0311$, $p = 0.0039$, $p = 0.0388$)和10 μ g/mL(分别 $p = 0.0008$, $p = 0.0027$, $p = 0.0023$)下显著减少%CD69⁺NK(重复测量单因素ANOVA,接着进行Dunnett多重比较检验;表14)。

[0423] 另外,测量NK细胞上的中值CD2荧光强度(CD2 MFI)以评估西利珠单抗或CD2结合分子2、3或4(FcS抗CD2 mAb)是否影响CD2表达(图13B-C)。相对于未处理的对照,西利珠单抗在0.001-10 μ g/mL($p \leq 0.0354$)下诱导NK细胞上的CD2 MFI显著降低。用0.01-10 μ g/mL的CD2结合分子1(一种去糖基化的CD2结合分子)($p \leq 0.0064$)、CD2结合分子2($p \leq 0.0050$)、CD2结合分子3($p \leq 0.0091$)和CD2结合分子4($p \leq 0.0142$)观察到不同程度的显著CD2下调(重复测量单因素ANOVA,接着进行Dunnett多重比较检验;表15)。

[0424] 6.6.5NK自相残杀

[0425] 为了测试西利珠单抗是否可以诱导NK细胞自相残杀,在递增剂量的西利珠单抗或Fc沉默抗CD2 mAb的存在下培养纯化的NK细胞。如图14所示,相对于未处理的对照,西利珠单抗在0.01-10 μ g/mL下显著增加纯化的NK细胞培养物中的NK细胞裂解($p \leq 0.0018$)。此外,与未处理的对照相比时,西利珠单抗在0.01-10 μ g/mL下诱导总NK细胞($p \leq 0.0301$)、CD56^{dim} NK细胞($p \leq 0.0191$)和CD56^{bright} NK细胞($p \leq 0.0093$)的显著剂量依赖性耗竭。相反,CD2结合分子2、3和4在纯NK培养物中并未诱导剂量依赖性的NK细胞裂解或耗竭,除了CD2结合分子3(FcS抗CD2 IgG2)在0.1-10 μ g/mL下诱导轻微但具有统计学显著的CD56^{bright} NK细胞耗竭以外($p \leq 0.0132$;重复测量单因素ANOVA,接着进行Dunnett多重比较检验;表16-19)。

[0426] 此外,图15显示西利珠单抗诱导NK细胞脱粒的显著剂量依赖性增加($p \leq 0.0114$; CD107a⁺Nk细胞)以及指示ADCC的NK细胞上CD16表达的强烈下降($p \leq 0.0022$)。CD2结合分子

2、3或4 (FcS抗CD2 mAb) 均未诱导脱粒,并且只有CD2结合分子3在0.1-1 μ g/mL下诱导CD16 MFI轻微但统计学显著的降低 ($p \leq 0.0269$; 重复测量单因素ANOVA,接着进行Dunnett多重比较检验;表20和21)。

[0427] 6.6.6 自然NK细胞毒性

[0428] 为了测试CD2阻滞对自然细胞毒性的影响,在SPI-801靶细胞 (HLA) 的存在下,将纯化的NK细胞与滴定剂量的西利珠单抗或CD2结合分子2、3或4一起孵育。如图16所示,用CD2结合分子2、3或4进行CD2阻滞并未显著抑制响应于SPI-801靶细胞的NK细胞脱粒,无论NK细胞与CD2结合分子2、3或4 (FcS抗CD2 mAb) 的预孵育在添加靶细胞之前持续30分钟还是2天。预孵育30分钟后,西利珠单抗在0.1-10 μ g/mL下显著增加NK细胞脱粒 ($p \leq 0.0482$),但在预孵育2天后没有增加 (重复测量单因素ANOVA,接着进行Dunnett多重比较检验;表22和23)。CD2阻滞不会引起SPI-801计数的任何变化 (数据未示出)。

[0429] 6.6.7 抗体依赖性细胞毒性

[0430] 为了测试CD2阻滞是否影响ADCC,在添加滴定剂量的利妥昔单抗和CD20⁺靶细胞 (Daudi) 之前,将纯化的NK细胞与西利珠单抗或CD2结合分子2、3或4一起预孵育。如图17A和17B所示,用CD2结合分子2、3或4进行的CD2阻滞并未显著影响响应于递增剂量的利妥昔单抗的NK细胞脱粒或靶细胞杀伤 (表24和25)。如图17C所展示,利妥昔单抗在0.01-1 μ g/mL下诱导NK细胞上CD2表达的显著增加 ($p \leq 0.0248$; 重复测量单因素ANOVA,接着进行Dunnett多重比较检验;表26)。虽然抗CD2 mAb在这种环境下诱导不同程度的CD2下调,但这似乎并不影响ADCC。

[0431] 表7:基于细胞的Fc γ RI信号传导测定。平均归一化发光 $\pm$ SD (N=3)。

[0432]

[抗体], 以 nM 计	西利珠单抗		CD2 结合分子 1		CD2 结合分子 2		CD2 结合分子 3		CD2 结合分子 4	
6.67	100.0	0.0	125.6	2.7	5.7	0.4	3.8	0.7	3.2	0.4
1.11	103.1	6.0	123.0	11.0	5.8	0.9	3.5	0.5	3.0	0.4
0.19	106.0	11.9	127.3	8.5	6.0	0.5	3.2	0.3	2.9	0.2
0.031	101.7	13.6	107.8	6.9	3.4	0.4	2.9	0.7	2.8	0.2
0.0051	26.7	3.9	41.9	2.6	2.5	0.3	2.6	0.1	2.6	0.5
0.00086	5.1	0.4	8.5	1.2	2.5	0.3	2.5	0.5	2.9	0.4
0.000143	2.4	0.7	2.5	0.4	2.4	0.6	2.4	0.4	2.6	0.5
0.000024	2.4	0.5	2.6	0.6	2.7	0.4	2.4	0.3	2.8	0.5

[0433] 表8:基于细胞的Fc γ RIIA信号传导测定。平均归一化发光 $\pm$ SD (N=3)。

[0434]

[抗体], 以 nM 计	西利珠单抗	CD2 结合分子 1		CD2 结合分子 2		CD2 结合分子 3		CD2 结合分子 4	
666.7	100.0	0.0							
111.1	107.8	17.5							
18.52	70.1	3.7							
3.09	45.3	1.2							
0.51	40.7	4.0							
0.086	11.0	1.4							
0.014	3.2	0.6							
0.002	3.0	0.3							
66.7		4.4	0.9	3.1	0.6	6.6	2.0	3.8	0.9
11.1		3.2	0.4	3.4	0.8	5.7	0.4	3.1	0.6
1.85		3.2	0.4	3.1	0.7	4.4	0.4	3.7	1.4
0.31		2.9	0.7	3.0	0.6	4.4	0.5	3.5	0.2
0.051		3.4	0.6	2.8	0.6	3.6	0.4	3.3	1.2
0.009		2.6	0.4	2.7	0.7	2.9	0.4	2.4	0.2
0.001		3.0	0.4	3.0	1.1	3.2	0.1	2.3	0.5
0.00024		2.6	0.4	2.5	0.5	3.0	0.5	3.4	0.4

[0435] 表9:基于细胞的Fc γ RIIIA信号传导测定。平均归一化发光 $\pm$ SD (N=3)。

[0436]

[抗体], 以 nM 计	西利珠单抗		CD2 结合分子1		CD2 结合分子2		CD2 结合分子3		CD2 结合分子4	
6.67	100.0	0.0	7.3	0.6	6.8	0.7	3.8	0.5	6.8	0.3
1.11	100.0	13.8	8.4	1.9	7.0	0.2	3.2	0.1	7.3	1.1
0.19	89.0	7.1	7.0	0.2	7.3	0.9	2.8	0.2	6.7	1.1
0.031	74.8	4.4	6.5	0.9	6.4	0.8	4.1	0.4	6.2	0.4
0.0051	44.5	3.9	6.5	0.7	6.3	0.5	5.4	0.2	6.4	0.9
0.00086	13.4	3.0	6.0	0.9	6.8	1.4	6.2	0.3	6.3	0.1
0.000143	6.6	0.9	7.5	2.0	6.7	0.5	6.5	0.6	6.1	1.4
0.000024	6.1	0.4	5.9	1.0	6.6	1.5	6.1	0.5	6.4	0.5

[0437] 表10:CD2表达。平均CD2中值荧光强度 $\pm$ SEM(N=5)。重复测量单因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验(* $p<0.05$,** $p<0.01$)。

[0438]

	平均 MFI	SEM
T 细胞	651.9	56.3
CD4 TN	442.6	7.6
CD4 TCM	644.7	48.9
CD4 TEM	791.8	102.4
CD4 TMERA	468.9	36.6
CD8 TN	655.7	28.3
CD8 TCM	852.5	147.9
CD8 TEM	1165.1	92.7
CD8 TEMRA	740.4	117.7
RTREG	442.1	43.2
NSTREG	621.1	38.7
ATREG	777.5	97.0
B 细胞	2.7**	21.2
CD56 ^{BRIGHT}	713.3	120.6
CD56 ^{DIM}	150.5**	33.1
CD56 ^{NEG} CD16 ⁺	145.1*	46.0

[0439] 表11:静止和活化PBMC上的CD2表达。双尾配对t检验结果(* $p<0.05$,** $p<0.01$)。数据显示为平均中值荧光强度 $\pm$ SEM。

[0440]

	T 细胞		B 细胞		CD56 ^{bright}		CD56 ^{dim}		CD56 ^{neg} CD16 ⁺	
RESTING	657.3	102.0	2.7	47.4	713.3	269.6	150.5	74.0	145.1	102.8
ACTIVATED	11226.6**	3749.1	0.0	196.4	3465.0*	1674.6	990.8**	256.1	990.8**	256.1

[0441] 表12:在混合淋巴细胞反应中随时间变化的CD69+NK细胞。CD69+NK细胞的平均百分比 $\pm$ SD(N=12)。重复测量双因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验(* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,**** $p<0.0001$)。

[0442]

时间, 以天计	无抗体		西利珠单抗		CD2 结合分子1	
0	5.6	4.4				
1	14.2	7.9	43.2****	12.4	14.6	6.6
2	15.5	6.4	32.7***	10.8	8.1***	4.3
4	33.2	19.4	36.5	17.7	16.1**	12.3
7	37.8	20.0	36.5	14.6	20.4**	12.7

[0443] 表13:在自体淋巴细胞培养中随时间变化的CD69+NK细胞。CD69+NK细胞的平均百分比 $\pm$ SD(N=12)。重复测量双因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验(* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,**** $p<0.0001$)。

[0444]	时间, 以天计	无抗体		西利珠单抗		CD2 结合分子 1	
	0	5.7	4.4				
	1	12.0	7.2	43.5****	17.7	15.1*	8.6
	2	6.3	3.8	34.5****	13.9	7.3	4.5
	4	9.6	7.7	24.4****	10.7	6.5**	6.3
	7	15.5	11.1	25.7**	8.2	13.1	8.2

[0445] 表14:在混合淋巴细胞反应应用递增剂量的抗CD2抗体孵育七天后的CD69+NK细胞。CD69+NK细胞的平均百分比 $\pm$ SD (N=9)。重复测量单因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验(* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$)。

[抗体], 以 $\mu\text{g/ml}$ 计	西利珠单抗		CD2 结合分子 1		CD2 结合分子 2		CD2 结合分子 3		CD2 结合分子 4	
	0									
[0446]	0	28.6	15.1							
	0.0001	29.6	15.8	31.3	14.3	34.9	16.3	33.1	14.8	31.3
	0.001	28.3	14.9	28.6	13.2	34.2	15.5	29.9	13.7	31.3
	0.01	41.0	23.1	23.2	10.9	27.2	14.3	29.4	13.7	28.4
	0.1	49.7***	17.7	23.2	11.3	19.8*	10.9	11.9*	4.2	19.9*
	1	42.9**	18.5	18.1**	12.0	18.7*	8.1	8.7**	4.3	18.6*
	10	42.1*	19.7	14.4**	8.0	14.3***	8.7	8.1**	4.9	14.1**

[0447] 表15:在混合淋巴细胞反应应用递增剂量的抗CD2抗体孵育七天后NK细胞上的CD2表达。NK细胞上的中值CD2荧光强度 $\pm$ SEM (N=9)。重复测量单因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验(* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,**** $p<0.0001$)。

[抗体], 以 $\mu\text{g/ml}$ 计	西利珠单抗		CD2 结合分子1		CD2 结合分子2		CD2 结合分子3		CD2 结合分子4		
	0	3091.0	358.0								
[0448]	0.0001	2912.0	397.8	2910.0*	371.7	3190.3	360.9	3148.6	396.7	3013.1	279.0
	0.001	2783.6*	347.8	3033.1	414.1	3146.7	406.9	3075.2	381.7	2876.9	322.7
	0.01	1968.2**	370.2	2393.1**	306.5	2378.8**	256.8	2447.1**	283.2	2418.6*	210.1
	0.1	139.8***	20.5	909.3***	135.0	1557.1***	206.4	816.0***	110.6	1245.3***	130.0
	1	124.8***	17.2	856.3***	146.5	1404.9***	177.5	284.1***	22.4	1059.8***	122.7
	10	156.2***	28.8	1073.4***	228.8	1466.1***	175.0	288.1***	26.8	950.8***	114.8

[0449] 表16:在经纯化NK细胞用递增剂量的抗CD2抗体孵育后的NK细胞裂解。7-AAD+NK细胞的平均百分比 $\pm$ SD (N=6)。重复测量单因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验(* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$)。

[抗体], 以 $\mu\text{g/ml}$ 计	西利珠单抗		CD2 结合分子 2		CD2 结合分子 3		CD2 结合分子 4		
	0	6.0	2.4						
[0450]	0.001	7.1	2.5	6.7	2.4	6.4	2.3	6.5	2.4
	0.01	14.6**	3.5	6.6	2.4	6.4	2.5	6.3	2.4
	0.1	28.8**	6.7	6.6	2.5	6.1	2.3	6.3	2.4
	1	33.3***	6.4	6.7	2.6	5.6	2.3	6.4	2.4
	10	35.0***	6.3	6.6	2.7	5.8	2.2	6.3	2.5

[0451] 表17:在经纯化NK细胞用递增剂量的抗CD2抗体孵育后的归一化NK细胞计数。平均归一化NK细胞计数 $\pm$ SD (N=6)。重复测量单因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验(* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,**** $p<0.0001$)。

[0452]	[抗体], 以 $\mu\text{g/ml}$ 计	西利珠单抗		CD2 结合 分子2		CD2 结合 分子3		CD2 结合 分子4	
	0	100.0	0.0						
	0.001	103.1	3.0	105.7	6.1	90.0	14.3	98.7	10.1
	0.01	81.0*	11.3	105.3	7.3	97.3	10.1	104.3*	2.3
	0.1	47.8***	10.6	102.0	15.1	100.1	6.8	106.6	4.6
	1	41.0****	8.4	105.5	10.9	104.7	4.6	106.3	5.6
	10	41.1****	8.2	107.4	8.2	103.2	7.3	102.6	14.3

[0453] 表18:在经纯化NK细胞用递增剂量的抗CD2抗体孵育后的归一化CD56^{dim} NK细胞计数。平均归一化CD56^{dim} NK细胞计数 $\pm$ SD (N=6)。重复测量单因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验(* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,**** $p<0.0001$)。

[抗体], 以 $\mu\text{g/ml}$ 计	西利珠单抗		CD2 结合 分子 2		CD2 结合 分子 3		CD2 结合 分子 4	
	0	100.0	0.0					
[0454]	0.001	102.8	2.8	106.1	6.1	90.1	14.2	99.0
	0.01	81.5*	9.8	105.7	6.9	97.8	10.5	104.4*
	0.1	50.7***	10.7	102.4	14.5	101.9	8.2	106.9*
	1	43.8****	8.6	106.3	10.3	106.3	4.8	106.9
	10	44.0****	8.4	107.2	8.1	104.9	8.0	102.5

[0455] 表19:在经纯化NK细胞用递增剂量的抗CD2抗体孵育后的归一化CD56^{bright} NK细胞计数。平均归一化CD56^{bright} NK细胞计数 $\pm$ SD (N=6)。重复测量单因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验(* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,**** $p<0.0001$)。

[抗体], 以 $\mu\text{g/ml}$ 计	西利珠单抗		CD2 结合 分子 2		CD2 结合 分子 3		CD2 结合 分子 4	
	0	100.0	0.0					
[0456]	0.001	94.6	10.2	95.4	13.7	89.2	14.5	91.4
	0.01	42.0**	25.8	98.5	22.3	83.6	13.5	102.4
	0.1	10.2****	5.1	93.9	22.2	64.7**	11.0	103.6
	1	7.0****	2.3	96.1	27.8	64.2**	14.8	100.1
	10	7.3****	3.3	108.9	12.6	71.9*	13.6	103.3

[0457] 表20:在纯化NK细胞用递增剂量的抗CD2抗体孵育后NK细胞上的CD107a表达。CD107a+NK细胞的平均百分比 $\pm$ SD (N=6)。重复测量单因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验(* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$)。

[抗体], 以 $\mu\text{g/ml}$ 计	西利珠单抗		CD2 结合 分子 2		CD2 结合 分子 3		CD2 结合 分子 4	
	0	1.6	1.9					
[0458]	0.001	2.0*	1.9	1.9	2.4	1.9	2.2	1.7
	0.01	4.3**	2.4	1.7	2.1	2.0	2.2	1.7
	0.1	10.9**	4.8	1.7	2.0	2.1	2.2	1.7
	1	13.0**	4.9	1.6	1.7	2.1	2.4	1.5
	10	14.8***	4.4	1.5	1.7	2.0	2.2	1.7

[0459] 表21:在经纯化NK细胞用递增剂量的抗CD2抗体孵育后NK细胞上的CD16表达。NK细胞上的中值CD16荧光强度 $\pm$ SEM (N=6)。重复测量单因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验(* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,**** $p<0.0001$)。

[抗体], 以 $\mu\text{g/ml}$ 计	西利珠单抗		CD2 结合 分子 2		CD2 结合 分子 3		CD2 结合 分子 4	
	0	1673.8	223.0					
[0460]	0.001	1577.5	242.6	1645.5	250.0	1624.0	220.4	1598.7
	0.01	553.7**	140.5	1671.2	259.9	1577.8	245.5	1612.3
	0.1	118.9**	43.1	1624.7	240.7	1491.0*	242.2	1589.5
	1	80.3**	21.5	1599.2	227.6	1464.2*	253.1	1589.2
	10	69.3**	15.1	1677.5	242.7	1502.8	248.8	1602.5

[0461] 表22:在经纯化NK细胞用递增剂量的抗CD2抗体和SPI-801靶细胞孵育后NK细胞上的CD107a表达。CD107a+NK细胞的平均百分比 $\pm$ SD (N=6)。在添加靶细胞之前NK细胞用抗CD2 mAb预孵育30分钟。重复测量单因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验(* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$)。

[抗体], 以 $\mu\text{g/ml}$ 计	西利珠单抗		FcS 抗 CD2 IgG1		FcS 抗 CD2 IgG2		FcS 抗 CD2 IgG4		仅 NK	
	0	14.7***	3.8						0.4***	0.2
[0462]	0.001	17.6	6.1	19.1	4.8	13.9	4.5	15.7	4.2	
	0.01	23.3	7.9	18.6	5.8	13.0	4.4	15.8	5.7	
	0.1	28.8*	8.0	16.0	5.5	13.1	5.9	13.4	4.5	
	1	37.9**	10.9	16.8	6.2	11.3	4.2	14.4	6.0	
	10	43.5**	12.6	16.6	5.3	12.6	5.3	14.5	4.7	

[0463] 表23:在经纯化NK细胞用递增剂量的抗CD2抗体和SPI-801靶细胞孵育后NK细胞上的CD107a表达。CD107a+NK细胞的平均百分比 $\pm$ SD (N=6)。在添加靶细胞之前NK细胞用抗

CD2 mAb预孵育48小时。重复测量单因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验(* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$)。

[抗体], 以 $\mu\text{g/ml}$ 计	西利珠单抗		CD2 结合 分子 2		CD2 结合 分子 3		CD2 结合 分子 4		仅 NK	
	0									
[0464]	0	14.7***	3.8						0.4***	0.2
	0.001	17.6	6.1	19.1	4.8	13.9	4.5	15.7	4.2	
	0.01	23.3	7.9	18.6	5.8	13.0	4.4	15.8	5.7	
	0.1	28.8*	8.0	16.0	5.5	13.1	5.9	13.4	4.5	
	1	37.9**	10.9	16.8	6.2	11.3	4.2	14.4	6.0	
	10	43.5**	12.6	16.6	5.3	12.6	5.3	14.5	4.7	

[0465] 表24:在经纯化NK细胞用递增剂量的利妥昔单抗和CD20+靶细胞孵育后NK细胞上的CD107a表达。CD107a+NK细胞的平均百分比 $\pm$ SD(N=6)。重复测量单因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验((*) $p < 0.1$,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$)。

[利妥昔单抗], 以 $\mu\text{g/ml}$ 计	无抗 CD2		西利珠单抗		CD2 结合 分子 2		CD2 结合 分子 3		CD2 结合 分子 4	
	0									
[0466]	0	2.2	2.5							
	0.0001	2.4	2.4	5.1(*)	4.3	2.2	2.1	1.7	1.7	2.3
	0.001	2.7	2.0	5.3*	4.3	2.6	2.2	1.9	1.8	2.6
	0.01	5.8(*)	2.8	5.4*	4.3	5.5*	3.0	4.7	3.0	5.3
	0.1	13.7*	7.1	7.0*	4.2	13.4*	7.0	12.8(*)	8.0	13.3(*)
	1	18.8(*)	10.9	8.7**	3.7	17.9*	9.8	15.4*	8.5	15.7*

[0467] 表25:在纯化NK细胞用递增剂量的利妥昔单抗和CD20+靶细胞孵育后的归一化靶细胞计数。平均归一化靶细胞计数 $\pm$ SD(N=6)。重复测量单因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验((*) $p < 0.1$,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$,**** $p < 0.0001$)。

[利妥昔单抗], 以 $\mu\text{g/ml}$ 计	无抗 CD2		西利珠单抗		CD2 结合 分子 2		CD2 结合 分子 3		CD2 结合 分子 4	
	0									
[0468]	0	100	0							
	0.0001	91.9	16.2	155.3	49.8	113.9	16.7	137.1	30.8	106.0
	0.001	82.4	22.8	145.3	47.9	99.0	31.4	114.9	32.1	85.5
	0.01	47.5**	15.2	132.9	35.9	53.2*	21.6	67.0*	24.6	59.9*
	0.1	29.6***	10.3	94.7	20.7	29.0***	13.3	28.2***	9.5	30.3***
	1	21.0****	8.0	64.1*	22.1	22.1****	10.6	22.8****	8.4	26.0****

[0469] 表26:在经纯化NK细胞用递增剂量的利妥昔单抗和CD20+靶细胞孵育后NK细胞上的CD2表达。NK细胞上的中值CD2荧光强度 $\pm$ SEM(N=6)。重复测量单因素ANOVA结果,接着进行Dunnett多重比较检验(* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$)。

[利妥昔单抗], 以 $\mu\text{g/ml}$ 计	无抗 CD2		西利珠单抗		CD2 结合 分子 2		CD2 结合 分子 3		CD2 结合 分子 4	
	0									
[0470]	0	3299.7	451.4							
	0.0001	3346.0	456.6	1050.0**	246.2	2469.3**	333.1	679.2**	71.8	1136.7**
	0.001	3452.2	456.6	1082.0**	245.9	2610.5*	334.7	706.5**	69.3	1249.7**
	0.01	3780.0*	491.8	1098.8**	250.9	3037.2	394.4	792.5**	84.4	1632.5**
	0.1	4155.3*	587.9	1206.5**	282.0	3647.2	470.9	898.2**	105.4	2369.7*
	1	4303.0*	601.5	1287.3**	303.4	3898.5*	495.1	889.3**	109.2	2660.2*

[0471] 6.7实施例6:抗CD2抗体或其抗原结合片段与CTLA-4共刺激阻滞剂的组合法

[0472] 本实施例描述了抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂的组合法在细胞增殖、CD2应答和CD28应答中的作用。

[0473] 6.7.1方法

[0474] 同种异体淋巴细胞反应(MLR):将来自两个供体的PBMC混合在PBS中,浓度为 $1.5-2.0 \times 10^7$ 个细胞/mL,并且用紫色增殖染料450(VPD450;BD Biosciences, San Diego, USA)按照制造商的说明书染色。该实验使用双向同种异体MLR(即来自两个供体的PBMC均未经由辐照/化学处理进行灭活)。因此,来自两个供体的PBMC都起到了应答子和刺激子的作用。

[0475] 将VPD450染色的PBMC洗涤并重悬于在AIM V培养基(Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)中的10%热灭活FBS(Gibco, Thermo Fisher Scientific

Inc., Waltham, USA) 中。将重悬的PBMC分配到圆底96孔细胞培养板(用于流式细胞术)中并且添加纯培养基(无抗体对照)或补充有抗CD2抗体1(例如, 西利珠单抗)和/或阿巴西普或贝拉西普的培养基至最终浓度为 2×10^6 个细胞/mL(最终体积200 μ L)。将MLR在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育七天和/或10天。第六天, 向每个孔添加100 μ L新鲜培养基(无附加抗体;最终体积=300 μ L)。第八天, 在不干扰细胞沉淀的情况下从每个孔中吸出100 μ L培养基, 并以100 μ L新鲜培养基替换。

[0476] 用于抗CD2抗体1滴定的抗体浓度介于1 μ g/mL至50.8pg/mL之间(在培养基中进行10步3倍连续稀释)。在所有连续稀释步骤中, 添加有CTLA4-Ig的抗CD2抗体1滴定补充有100 μ g/mL阿巴西普或贝拉西普。用于阿巴西普/贝拉西普滴定的融合蛋白浓度介于100 μ g/mL至0.1pg/mL之间(在培养基中进行10步10倍连续稀释)。在所有连续稀释步骤中, 添加有抗CD2抗体1的阿巴西普/贝拉西普滴定补充有1 μ g/mL抗CD2抗体1。

[0477] 流式细胞术: 在七天的MLR之后, 将样品用Fc受体结合抑制剂(Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)封闭, 然后用抗CD3 VioGreen(克隆REA613; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany)、抗CD45RA BV650(克隆HI100; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CD2 BV786(克隆RPA-2.10; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CD8 BB550(克隆RPA-T8; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CD56 PE(克隆REA196; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany)、抗HLA-DR PerCP-Cy5.5(克隆G46-6; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CCR7 APC(克隆G43H7; BD Biosciences, San Diego USA)和抗CD4 APC-Vio770(克隆REA623; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany)进行染色。将T细胞作为CD3⁺CD56⁻门控。在10天的MLR之后, 将样品用Fc受体结合抑制剂(Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)封闭, 然后用抗CD45RA BV650(克隆HI100; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CD3 BV786(克隆SK7; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CD8 BB550(克隆RPA-T8; BD Biosciences, San Diego USA)、抗FoxP3 PE(克隆236A/E7; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CD127 PerCP-Cy5.5(克隆HIL-7R-M21[BD Biosciences, San Diego USA]或A019D5[Biolegend, Sunnyvale USA])、抗CCR7 APC(克隆G43H7; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CD25 Alexa Fluor 700(克隆M-A251; BD Biosciences, San Diego USA)和抗CD4 APC-Vio770(克隆REA623; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany)进行染色。将T细胞作为CD3⁺门控。使用VPD450(VPD450高: 未增殖的; VPD450低: 增殖的)评估细胞增殖。将样品在4 $^{\circ}$ C下在黑暗中染色, 并且在盐水溶液中洗涤两次, 接着使用BD Celesta流式细胞仪(BD Biosciences, San Diego USA)进行采集。使用eBioscience FoxP3/转录因子染色缓冲液组(Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)根据制造商的说明书进行细胞内FoxP3染色。将Treg鉴定为CD4⁺CD127⁻CD25⁺FoxP3⁺。

[0478] 图表和统计学分析: 使用GraphPad Prism 8软件(GraphPad Software, San Diego, USA)进行结果的可视化和基础数据的统计分析(参考表27-35)。使用单因素ANOVA分析数据, 接着以无抗体的对照用作比较数据集进行Dunnett多重比较检验。

[0479] 6.7.2结果

[0480] T细胞增殖: 在七天和10天的MLR后, 经由流式细胞术评估T细胞增殖, 以评估将抗CD2抗体1(例如, 西利珠单抗)与阿巴西普或贝拉西普组合的抑制作用(n=6; 表27-30)。如

图18A所示,10-100 μ g/mL阿巴西普(或在某些情况下为阿法西普) ($p \leq 0.0303$)、1-100 μ g/mL贝拉西普 ($p \leq 0.0156$) 和0.012-1 μ g/mL抗CD2抗体1 ($p \leq 0.0105$) 相对于未处理的对照在七天的MLR后诱导CD4 T细胞增殖的显著减少。此外,100 μ g/mL阿巴西普(或在某些情况下为阿法西普) ($p \leq 0.0028$)、1-100 μ g/mL贝拉西普 ($p \leq 0.0411$) 和0.11-1 μ g/mL抗CD2抗体1 ($p \leq 0.0071$) 在十天的MLR后诱导CD4 T细胞增殖的显著减少(图18C)。另外,抗CD2抗体1与100 μ g/mL阿巴西普 ($p \leq 0.0183$) 或100 μ g/mL贝拉西普 ($p \leq 0.0061$) 的组合介导CD4 T细胞增殖的显著且近乎完全的抑制(图18A和18C)。与阿巴西普或贝拉西普的组合疗法在MLR的第7天使抗CD2抗体1的抑制作用的半数最大抑制浓度(IC₅₀)从0.0068 μ g/mL(单一疗法)分别降低到0.0015 μ g/mL和0.0011 μ g/mL。在十天的MLR后,抗CD2抗体1单一疗法的IC₅₀为0.0235 μ g/mL并且与100 μ g/mL阿巴西普或100 μ g/mL贝拉西普的组的IC₅₀分别为0.0035 μ g/mL或0.0025 μ g/mL。对于CD8 T细胞增殖的抑制观察到类似的模式(图18B和18D)。在七天的MLR之后,抗CD2抗体1单一疗法对CD8 T细胞增殖的抑制的IC₅₀为0.0105 μ g/mL,而与阿巴西普或贝拉西普的组合疗法对于抗CD2抗体1与阿巴西普的组合以及抗CD2抗体1与贝拉西普的组合将抗CD2抗体1的IC₅₀降低到0.0012 μ g/mL。在10天的MLR后,抗CD2抗体1单一疗法的IC₅₀为0.024 μ g/mL,当与阿巴西普或贝拉西普组合时,降低到0.0017 μ g/mL。如图18E-18H所示,在单独的实验(具有相同条件)中观察到类似的结果。

[0481] 表27:7天同种异体混合淋巴细胞反应后的CD4 T细胞增殖

[0482]

[抗体/融合蛋白] μg/mL	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗体 1		抗 CD2 抗体 1 + 100 μg/mL 阿巴西普		抗 CD2 抗体 1 + 100 μg/mL 贝拉西普	
0	80.8	2.0 (SD)								
100	43.0*	15.8 (SD)	40.6**	13.5 (SD)						
10	44.5*	12.9 (SD)	51.9*	10.3 (SD)						
1	47.6	20.1 (SD)	46.2**	10.1 (SD)						
0.1	56.7	15.1 (SD)	53.9	15.7 (SD)						
0.01	73.6	7.3 (SD)	70.4	9.9 (SD)						
0.001	81.9	3.8 (SD)	75.9	7.5 (SD)						
0.0001	83.5	4.4 (SD)	80.0	7.6 (SD)						
0.00001	79.4	8.5 (SD)	84.5	3.2 (SD)						
0.000001	83.2	2.7 (SD)	83.2	3.0 (SD)						
0.0000001	82.5	3.6 (SD)	79.2	8.2 (SD)						
1					6.3** **	3.8 (SD)	1.6** **	1.6 (SD)	0.9*** *	0.3 (SD)
0,333333					7.1** **	4.3 (SD)	1.3** **	0.9 (SD)	2.9*** *	4.7 (SD)
0,111111					8.3** **	5.6 (SD)	1.6** **	1.2 (SD)	1.1*** *	0.9 (SD)
0,037037					9.0** **	8.0 (SD)	2.2** **	2.5 (SD)	2.2*** *	1.9 (SD)
0,012346					20.9*	20.2 (SD)	2.8** **	3.1 (SD)	2.9*** *	3.8 (SD)
0,004115					61.6	21.6	9.0**	9.8	9.7***	8.0

[0483]

[抗体/融合蛋白] μg/mL	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗体 1		抗 CD2 抗体 1 + 100 μg/mL 阿巴西普		抗 CD2 抗体 1 + 100 μg/mL 贝拉西普	
						(SD)	*	(SD)	*	(SD)
0,001372					82.3	8.1 (SD)	24.8 **	17.8 (SD)	24.4**	11.2 (SD)
0,000457					84.6	3.9 (SD)	36.7 **	14.0 (SD)	40.5**	13.3 (SD)
0,000152					73.2	14.4 (SD)	41.8 *	16.0 (SD)	49.2**	9.6 (SD)
0,0000508					83.7	7.1 (SD)	40.0 **	13.2 (SD)	48.1**	8.4 (SD)

[0484] 数据显示为增殖的CD4 T细胞的平均百分比+标准偏差(SD) (N=6个供体对)。使用单因素ANOVA分析数据,接着以未处理的对照(无抗体)用作比较数据集进行Dunnett多重比较检验(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001)。标准偏差显示为SD。

[0485] 表28:10天同种异体混合淋巴细胞反应后的CD4 T细胞增殖

[0486]

[抗体/ 融合蛋 白] $\mu\text{g}/\text{mL}$	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗体 1		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿巴 西普		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贝拉 西普	
0	85.9	5.9 (SD)								
100	64.2* *	9.2 (SD)	65.3 *	14.6 (SD)						
10	69.9	13.8 (SD)	64.8 *	14.4 (SD)						
1	65.3	19.9 (SD)	62.1 *	11.3 (SD)						
0.1	76.1	9.2 (SD)	69.4	14.0 (SD)						
0.01	80.5	8.8 (SD)	76.0	10.6 (SD)						
0.001	86.3	5.6 (SD)	83.8	8.6 (SD)						
0.0001	87.5	5.1 (SD)	86.1	5.6 (SD)						
0.00001	84.7	7.4 (SD)	84.5	7.7 (SD)						
0.000001	86.0	7.3 (SD)	84.8	5.8 (SD)						
0.000000 1	84.8	5.4 (SD)	88.1	4.4 (SD)						
1					21.4* *	20.7 (SD)	1.8** **	1.8 (SD)	1.9*** *	1.2 (SD)
0,333333					27.7*	17.8	2.3**	1.9	1.9***	1.3

[0487]

[抗体/ 融合蛋 白] $\mu\text{g}/\text{mL}$	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗体 1		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿巴 西普		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贝拉 西普	
					*	(SD)	**	(SD)	*	(SD)
0,111111					24.8*	12.2 (SD)	2.5**	1.7 (SD)	3.6***	3.4 (SD)
0,037037					43.2	24.8 (SD)	4.6**	7.7 (SD)	2.5***	1.8 (SD)
0,012346					68.1	27.2 (SD)	10.4*	14.4 (SD)	8.5***	11.2 (SD)
0,004115					79.5	11.0 (SD)	30.1*	21.5 (SD)	26.5*	24.7 (SD)
0,001372					82.9	8.4 (SD)	47.4*	19.0 (SD)	42.4**	16.6 (SD)
0,000457					86.6	7.7 (SD)	62.6	15.4 (SD)	54.9	20.4 (SD)
0,000152					84.1	7.5 (SD)	62.9	15.2 (SD)	62.2*	13.0 (SD)
0,000050 8					87.8	4.8 (SD)	58.2*	13.0 (SD)	61.6*	16.3 (SD)

[0488] 数据显示为增殖的CD4 T细胞的平均百分比+标准偏差(SD) (N=6个供体对)。使用单因素ANOVA分析数据,接着以未处理的对照(无抗体)用作比较数据集进行Dunnett多重比较检验(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)。

[0489] 表29:7天同种异体混合淋巴细胞反应后的CD8 T细胞增殖

[0490]

[抗体 /融 合蛋 白] μg /mL	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗体 1		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿巴 西普		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贝拉 西普	
0	85.0	6.1 (SD)								
100	60.5	21.2 (SD)	40.8**	18.5 (SD)						
10	57.4	20.4 (SD)	53.9	23.9 (SD)						
1	60.0	20.2 (SD)	61.4*	11.2 (SD)						
0.1	65.1	17.7 (SD)	60.0	22.5 (SD)						
0.01	85.1	8.5 (SD)	82.4	9.5 (SD)						
0.001	86.0	9.6	84.4	4.4						

[0491]

[抗体 /融 合蛋 白] μg /mL	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗体 1		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿巴 西普		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贝拉 西普	
		(SD)		(SD)						
0.000 1	85.4	8.1 (SD)	88.6	6.4 (SD)						
0.000 01	83.7	7.9 (SD)	87.9	8.5 (SD)						
0.000 001	85.6	10.3 (SD)	87.6	7.5 (SD)						
0.000 0001	86.6	7.9 (SD)	87.3	6.9 (SD)						
1					9.4*** *	8.0 (SD)	2.2*** *	1.9 (SD)	2.2*** *	2.1 (SD)
0,333 333					7.9*** *	9.2 (SD)	2.8*** *	2.5 (SD)	2.3*** *	2.1 (SD)
0,111 111					9.8***	11.4 (SD)	2.5*** *	2.5 (SD)	2.1*** *	2.0 (SD)
0,037 037					13.1** *	12.8 (SD)	3.7*** *	4.0 (SD)	1.9*** *	2.0 (SD)
0,012 346					39.6	33.6 (SD)	4.1*** *	4.5 (SD)	8.6*** *	7.9 (SD)
0,004 115					76.1	22.8 (SD)	10.3** *	11.9 (SD)	6.5*** *	5.7 (SD)
0,001 372					89.1	7.6 (SD	24.5**	22.3 (SD	25.7**	16.5 (SD

[0492]

[抗体 /融合 蛋白] μg /mL	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗体 1		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿巴 西普		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贝拉 西普	
						)		)		)
0,000 457					87.9	5.9 (SD)	45.3*	19.3 (SD)	35.6*	22.3 (SD)
0,000 152					84.8	10.9 (SD)	42.7*	19.2 (SD)	48.5*	21.5 (SD)
0,000 0508					85.8	9.4 (SD)	50.9*	18.7 (SD)	42.6*	24.3 (SD)

[0493] 数据显示为增殖的CD8 T细胞的平均百分比+标准偏差(SD) (N=6个供体对)。使用单因素ANOVA分析数据,接着以未处理的对照(无抗体)用作比较数据集进行Dunnett多重比较检验(* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,**** $p<0.0001$)。

[0494] 表30:10天同种异体混合淋巴细胞反应后的CD8 T细胞增殖

[0495]

[抗体 /融合 蛋白] μg /mL	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗体 1		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿巴 西普		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贝拉 西普	
0	94.6	3.1 (SD)								
100	73.7	17.7	79.8	10.6						

[0496]

[抗体 /融合 蛋白] μg /mL	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗体 1		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿巴 西普		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贝拉 西普	
		(SD)		(SD)						
10	83.4	9.5 (SD)	78.1	12.9 (SD)						
1	87.7	6.6 (SD)	73.9	17.4 (SD)						
0.1	89.6	6.7 (SD)	81.1	11.6 (SD)						
0.01	93.0	2.9 (SD)	90.6	6.3 (SD)						
0.001	94.7	2.7 (SD)	94.2	3.1 (SD)						
0.0001	94.9	4.2 (SD)	94.8	1.9 (SD)						
0.0000 1	95.1	2.2 (SD)	94.8	2.4 (SD)						
0.0000 01	95.2	1.6 (SD)	94.2	3.4 (SD)						
0.0000 001	94.4	2.8 (SD)	94.5	2.4 (SD)						
1					15.0** *	13.1 (SD)	5.2*** *	7.5 (SD)	2.8*** *	3.0 (SD)
0,3333 33					15.2** *	14.0 (SD)	3.4*** *	4.5 (SD)	2.3*** *	1.8 (SD)

[0497]

[抗体 /融合 蛋白] μg /mL	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗体 1		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿巴 西普		抗 CD2 抗体 1 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贝拉 西普	
						)		)		)
0,1111 11					21.8*	27.0 (SD)	2.1*** *	1.5 (SD)	5.4*** *	9.0 (SD)
0,0370 37					32.0*	29.9 (SD)	4.3*** *	4.3 (SD)	2.5*** *	2.3 (SD)
0,0123 46					76.3	26.6 (SD)	7.4*** *	10.3 (SD)	4.2*** *	4.1 (SD)
0,0041 15					92.8	4.0 (SD)	27.4*	34.3 (SD)	23.3*	30.7 (SD)
0,0013 72					93.0	6.3 (SD)	44.4	32.4 (SD)	44.2	30.0 (SD)
0,0004 57					94.4	2.7 (SD)	62.5	24.4 (SD)	63.0	25.5 (SD)
0,0001 52					93.3	3.0 (SD)	77.6	14.3 (SD)	72.8	13.4 (SD)
0,0000 508					93.7	4.2 (SD)	73.1	17.7 (SD)	70.9	18.5 (SD)

[0498] 数据显示为增殖的CD8 T细胞的平均百分比+标准偏差(SD) (N=6个供体对)。使用单因素ANOVA分析数据,接着以未处理的对照(无抗体)用作比较数据集进行Dunnett多重比较检验(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)

[0499] 测试不同浓度的阿巴西普和贝拉西普以确定与抗CD2抗体1组合达到最大功效所需的阿巴西普和贝拉西普的浓度(图19A-19H和图20)。因此,在保持抗CD2抗体1的浓度固定的同时,滴定阿巴西普或贝拉西普的浓度(对于图19A-19D而言 $n=9$ 并且对于图19E-19H而言 $n=3$;表31-34)。在图19A-19H中示出了在细胞与对照、抗CD2抗体1、贝拉西普、阿巴西普、抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合一起孵育7天或10天后的平均T细胞(CD4和CD8)增殖。测试了不同量的贝拉西普和阿巴西普(介于 ~ 1 -100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间)。当不同量的贝拉西普(1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与抗CD2抗体1组合使用时以及当不同量的阿巴西普

(10-100 μ g/mL)与抗CD2抗体1组合使用时观察到协同作用。

[0500] 表31:7天同种异体混合淋巴细胞反应后的CD4⁺ T细胞增殖

[0501]

[抗体 / 融合 蛋白] μ g /mL	阿巴西普		贝拉西普		抗CD2抗体 1		阿巴西普 + 1 μ g/mL 抗 CD2 抗体 1		贝拉西普 + 1 μ g/mL 抗 CD2 抗体 1	
0	65.2	13.4 (SD)								
100	23.1** *	13.3 (SD)	22. 1** *	14.5 (SD)			1.4** **	1.0 (SD)	1.5*** *	0.9 (SD)
10	26.5** *	15.7 (SD)	21. 0** *	14.0 (SD)			1.9** **	1.0 (SD)	2.2*** *	2.2 (SD)
1	31.4** **	15.8 (SD)	23. 8** *	8.5 (SD)			4.1** **	3.1 (SD)	1.5*** *	0.8 (SD)
0.1	36.1** **	17.8 (SD)	32. 0** *	11.0 (SD)			5.8** **	3.3 (SD)	2.8*** *	1.6 (SD)
0.01	60.3	18.8 (SD)	43. 3*	21.9 (SD)			6.7** **	5.0 (SD)	6.3*** *	4.2 (SD)
0.001	67.1	12.6 (SD)	56. 4	20.1 (SD)			9.9** **	7.6 (SD)	7.9*** *	6.8 (SD)
0.000 1	64.0	19.1 (SD)	64. 8	17.8 (SD)			7.4** **	3.4 (SD)	8.0*** *	5.2 (SD)
0.000 01	61.6	16.6 (SD)	66. 7	14.0 (SD)			8.1** **	5.9 (SD)	10.6** **	6.9 (SD)
0.000 001	64.3	17.4 (SD)	61. 8	16.3 (SD)			9.0** **	6.9 (SD)	8.2*** *	5.3 (SD)
0.000 0001	58.4	18.0 (SD)	60. 4	19.2 (SD)			7.2** **	4.7 (SD)	8.8*** *	4.7 (SD)
1					10.8	8.0				

[0502]

[抗体 / 融合蛋白] $\mu\text{g/mL}$	阿巴西普		贝拉西普		抗CD2 抗体 1		阿巴西普 + 1 $\mu\text{g/mL}$ 抗 CD2 抗体 1		贝拉西普 + 1 $\mu\text{g/mL}$ 抗 CD2 抗体 1	
					****	(SD)				
0,333 333					10.7 ****	7.6 (SD)				
0,111 111					11.7 ****	9.2 (SD)				
0,037 037					15.3 ***	13.8 (SD)				
0,012 346					35.9 **	13.5 (SD)				
0,004 115					62.7	16.0 (SD)				
0,001 372					68.5	10.9 (SD)				
0,000 457					65.0	17.4 (SD)				
0,000 152					65.1	19.0 (SD)				
0,000 0508					65.9	16.9 (SD)				

[0503] 数据显示为增殖的CD4 T细胞的平均百分比+标准偏差(SD) (N=9个供体对)。使用单因素ANOVA分析数据,接着以未处理的对照(无抗体)用作比较数据集进行Dunnett多重比较检验(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)

[0504] 表32:10天同种异体混合淋巴细胞反应后的CD4 T细胞增殖

[0505]

[抗体 /融合蛋白] μg /mL	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗体 1		阿巴西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1		贝拉西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1	
0	74.1	13.6 (SD)								
100	37.6** **	17.7 (SD)	41.1* **	17.1 (SD)			2.8*** *	2.1 (SD)	2.9** **	2.4 (SD)
10	45.2** *	12.6 (SD)	41.1* **	16.4 (SD)			4.3*** *	3.6 (SD)	2.3** **	1.7 (SD)
1	54.4**	14.1 (SD)	42.9* **	18.1 (SD)			10.6** **	8.0 (SD)	3.0** **	2.9 (SD)
0.1	55.3* *	15.7 (SD)	48.7* **	11.4 (SD)			21.0** *	19.1 (SD)	9.7** **	11.9 (SD)
0.01	67.5	16.5	62.0	11.7			25.2**	19.3	18.0	14.5

[0506]

[抗体 /融合 蛋白] μg /mL	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗 体 1		阿巴西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1		贝拉西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1	
		(SD)		(SD)				(SD)	***	(SD)
0.001	76.2	11.4 (SD)	71.0	13.0 (SD)			28.0** *	15.6 (SD)	26.0 **	19.6 (SD)
0.000 1	73.3	14.3 (SD)	75.0	9.3 (SD)			30.9**	16.6 (SD)	28.7 ***	18.4 (SD)
0.000 01	74.3	14.3 (SD)	73.5	12.3 (SD)			29.3**	19.3 (SD)	24.5 ***	12.8 (SD)
0.000 001	72.1	13.2 (SD)	69.5	19.3 (SD)			28.4**	16.0 (SD)	29.6 ***	14.7 (SD)
0.000 0001	70.8	19.3 (SD)	72.1	18.0 (SD)			27.4**	15.6 (SD)	25.5 ***	16.0 (SD)
1					28.0 **	17.9 (SD)				
0,333 333					34.6 **	19.4 (SD)				
0,111 111					42.6 *	18.3 (SD)				
0,037 037					55.9	21.3 (SD)				
0,012 346					70.9	17.0 (SD)				
0,004 115					73.8	10.3 (SD)				
0,001 372					78.4	8.5 (SD)				
0,000 457					73.1	13.4 (SD)				
0,000 152					70.9	16.4 (SD)				
0,000 0508					76.9	13.2 (SD)				

[0507] 数据显示为增殖的CD4⁺ T细胞的平均百分比+标准偏差(SD) (N=9个供体对)。使用单因素ANOVA分析数据,接着以未处理的对照(无抗体)用作比较数据集进行Dunnett多重比较检验(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001)

[0508] 表33:7天同种异体混合淋巴细胞反应后的CD8⁺ T细胞增殖

[0509]

[抗体 / 融合蛋白] $\mu\text{g}/\text{mL}$	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗体 1		阿巴西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1		贝拉西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1	
0	80.5	11.9 (SD)								
100	35.3* *	24.6 (SD)	27.8 ***	17.3 (SD)			1.1*** *	1.0 (SD)	1.6***	1.3 (SD)
10	31.0* **	17.0 (SD)	33.3 **	24.8 (SD)			1.3*** *	0.8 (SD)	1.6***	1.3 (SD)
1	46.9* *	17.9 (SD)	41.6 **	23.5 (SD)			2.3*** *	1.4 (SD)	1.4***	0.9 (SD)
0.1	51.2*	15.6 (SD)	41.3 **	22.0 (SD)			3.9*** *	2.6 (SD)	2.8***	2.2 (SD)
0.01	74.4	13.4 (SD)	60.3	19.9 (SD)			7.9*** *	4.9 (SD)	5.1***	2.6 (SD)
0.001	80.7	11.5 (SD)	74.9	15.7 (SD)			7.8*** *	4.6 (SD)	6.9***	4.9 (SD)
0.000 1	78.0	13.3 (SD)	77.2	15.7 (SD)			8.0*** *	4.5 (SD)	8.1***	6.7 (SD)
0.000 01	78.2	15.7 (SD)	79.5	13.8 (SD)			7.1*** *	4.7 (SD)	8.9***	4.5 (SD)
0.000 001	77.9	15.7 (SD)	77.9	17.0 (SD)			7.2*** *	5.3 (SD)	7.8***	4.9 (SD)
0.000 0001	77.4	10.6 (SD)	78.3	12.0 (SD)			7.8*** *	5.3 (SD)	12.4*** *	10.2 (SD)
1					7.9*** *	4.7 (SD)				

[0510]

[抗体 / 融合蛋白] $\mu\text{g}/\text{mL}$	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗体 1		阿巴西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1		贝拉西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1	
0,333 333					9.5*** *	5.7 (SD)				
0,111 111					11.4* ***	5.6 (SD)				
0,037 037					15.0* ***	8.2 (SD)				
0,012 346					49.1* (SD)	24.3 (SD)				
0,004 115					68.4 (SD)	26.1 (SD)				
0,001 372					70.3 (SD)	21.7 (SD)				
0,000 457					74.9 (SD)	18.5 (SD)				
0,000 152					80.6 (SD)	13.5 (SD)				
0,000 0508					79.6 (SD)	11.4 (SD)				

[0511] 数据显示为增殖的CD8 T细胞的平均百分比+标准偏差(SD) (N=9个供体对)。使用单因素ANOVA分析数据,接着以未处理的对照(无抗体)用作比较数据集进行Dunnett多重比较检验(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)

[0512] 表34:10天同种异体混合淋巴细胞反应后的CD8 T细胞增殖

[0513]

[抗体 / 融合蛋白] $\mu\text{g}/\text{mL}$	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗体 1		阿巴西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1		贝拉西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1	
0	88.9	8.7 (SD)								
100	56.3*	24.5 (SD)	50.7**	23.3 (SD)			1.5*** *	1.6 (SD)	1.5*** *	1.5 (SD)
10	67.	20.8	55.7	21.1			2.4***	1.8	1.2***	1.1

[0514]

[抗体 /融合 蛋白] μg /mL	阿巴西普		贝拉西普		抗CD2抗体1		阿巴西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1		贝拉西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1	
	7*	(SD)	**	(SD)			*	(SD)	*	(SD)
1	68. 0*	20.1 (SD)	57.1 **	22.4 (SD)			6.2*** *	6.5 (SD)	1.6*** *	1.2 (SD)
0.1	74. 2*	16.0 (SD)	58.3 *	23.2 (SD)			12.0** **	9.9 (SD)	4.5*** *	5.8 (SD)
0.01	86. 5	12.8 (SD)	80.2 *	12.7 (SD)			12.2** **	9.1 (SD)	8.0*** *	6.1 (SD)
0.001	88. 8	7.4 (SD)	85.9	12.3 (SD)			13.5** **	11.7 (SD)	11.5* ***	8.0 (SD)
0.000 1	87. 0	9.9 (SD)	87.7	10.5 (SD)			17.8** **	15.1 (SD)	11.9* ***	5.6 (SD)
0.000 01	88. 5	10.1 (SD)	88.9	7.5 (SD)			14.0** **	13.5 (SD)	13.6* ***	6.6 (SD)
0.000 001	86. 2	12.9 (SD)	88.4	7.4 (SD)			15.1** **	10.2 (SD)	15.0* ***	9.3 (SD)
0.000 0001	87. 3	10.8 (SD)	88.5	9.3 (SD)			13.3** **	12.7 (SD)	11.9* ***	8.3 (SD)
1					16.1** **	11.8 (SD)				
0,333 333					17.6** **	14.4 (SD)				
0,111 111					25.3** *	19.6 (SD)				
0,037 037					42.0* (SD)	27.4 (SD)				
0,012 346					77.7 (SD)	19.6 (SD)				
0,004 115					81.6 (SD)	18.6 (SD)				
0,001 372					85.2 (SD)	12.7 (SD)				
0,000 457					85.7 (SD)	10.5 (SD)				
0,000					86.9	10.8				

[0515]

[抗体/融合蛋白] $\mu\text{g/mL}$	阿巴西普		贝拉西普		抗CD2抗体1		阿巴西普 + 1 $\mu\text{g/mL}$ 抗CD2 抗体 1		贝拉西普 + 1 $\mu\text{g/mL}$ 抗CD2 抗体 1	
152						(SD)				
0,000 0508					87.4	11.6 (SD)				

[0516] 数据显示为增殖的CD8 T细胞的平均百分比+标准偏差(SD) (N=9个供体对)。使用单因素ANOVA分析数据,接着以未处理的对照(无抗体)用作比较数据集进行Dunnett多重比较检验(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)

[0517] 调控性T细胞(Treg)富集:评价抗CD2抗体1(例如,西利珠单抗)和阿巴西普或贝拉西普的组合疗法它们在MLR中的Treg富集作用(图21)。在该实验中,MLR补充了递增浓度的阿巴西普(1×10^{-7} 至 $100 \mu\text{g/mL}$)、贝拉西普(1×10^{-7} 至 $100 \mu\text{g/mL}$)和抗CD2抗体1(5.08×10^{-5} 至 $1 \mu\text{g/mL}$)。此外,阿巴西普或贝拉西普的附加滴定系列(1×10^{-7} 至 $100 \mu\text{g/mL}$)在整个滴定系列中补充了 $1 \mu\text{g/mL}$ 抗CD2抗体1。在10天的MLR后,经由流式细胞术测量增殖的CD4 T细胞中的Treg百分比($n=9$) (表35)。观察到抗CD2抗体1在 $0.037-1 \mu\text{g/mL}$ 下在增殖的CD4 T细胞中诱导Treg显著富集($p \leq 0.0338$) (图21)。相反,抗CD2抗体1与递增剂量的阿巴西普或贝拉西普的组合在增殖的CD4 T细胞中诱导Treg百分比的剂量依赖性降低。值得注意的是,一旦阿巴西普或贝拉西普的浓度增加达到T细胞增殖的最大抑制的情况($10-100 \mu\text{g/mL}$ 阿巴西普或 $1-100 \mu\text{g/mL}$ 贝拉西普),就会损失显著的Treg富集。

[0518] 表35:10天同种异体混合淋巴细胞反应后VPD450低CD4 T细胞中的Treg富集

[0519]

[抗体/融合蛋白] $\mu\text{g/mL}$	阿巴西普		贝拉西普		抗CD2抗体1		阿巴西普 + 1 $\mu\text{g/mL}$ 抗CD2 抗体 1		贝拉西普 + 1 $\mu\text{g/mL}$ 抗CD2 抗体 1	
0	5.4	6.2 (SD)								
100	8.7	9.4 (SD)	8.3	12.9 (SD)			5.2	4.5 (SD)	3.4	3.1 (SD)
10	11.2	11.7 (SD)	11.2	15.3 (SD)			9.0	7.1 (SD)	6.5	5.7 (SD)
1	9.7	9.2	10.2	10.7			20.2**	8.6	6.9	6.2

[0520]

[抗体/ 融合蛋 白] $\mu\text{g}/\text{mL}$	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗 体 1		阿巴西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1		贝拉西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1	
		(SD)		(SD)				(SD)		(SD)
0.1	11.1	10.0 (SD)	15.5	15.1 (SD)			20.0**	7.2 (SD)	17.2	9.1 (SD)
0.01	7.2	6.5 (SD)	9.1	8.4 (SD)			24.3**	8.2 (SD)	23.2*	13.8 (SD)
0.001	5.5	5.7 (SD)	7.0	8.0 (SD)			27.0**	14.2 (SD)	23.8*	12.1 (SD)
0.0001	5.0	5.6 (SD)	5.4	6.4 (SD)			27.7** *	11.3 (SD)	22.3*	8.0 (SD)
0.00001	5.5	5.9 (SD)	6.1	7.0 (SD)			29.2*	16.0 (SD)	25.8* *	7.6 (SD)
0.000001	6.2	6.4 (SD)	5.4	5.0 (SD)			30.6** *	9.1 (SD)	28.0* *	11.5 (SD)
0.000000 1	5.3	5.8 (SD)	5.2	5.9 (SD)			27.1**	14.2 (SD)	23.0* *	10.8 (SD)
1					27.3* *	12.0 (SD)				
0,333333					22.0*	11.7 (SD)				
0,111111					20.9*	12.4 (SD)				
0,037037					18.1*	12.1 (SD)				

[0521]

[抗体/ 融合蛋 白] $\mu\text{g}/\text{mL}$	阿巴西普		贝拉西普		抗 CD2 抗 体 1		阿巴西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1		贝拉西普 + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD2 抗体 1	
0,012346					12.1	12.4 (SD)				
0,004115					7.2	9.5 (SD)				
0,001372					6.7	9.2 (SD)				
0,000457					5.3	6.6 (SD)				
0,000152					6.6	7.2 (SD)				
0,000050 8					5.0	5.4 (SD)				

[0522] 数据显示为增殖的 (VPD450低) CD4⁺ T细胞中的Treg平均百分比+标准偏差 (SD) (N=9个供体对)。使用单因素ANOVA分析数据,接着以未处理的对照(无抗体)用作比较数据集进行Dunnett多重比较检验(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)。

[0523] 该实验还显示,与单独用贝拉西普或阿巴西普孵育的T细胞相比,用抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合孵育T细胞产生更低的CD2水平(图22A-22B)。如图22A-22B所示,在阿巴西普或贝拉西普的存在下增殖的T细胞展示出相对高的CD2表达(7天MLR后的平均CD2 MFI+SD (n=3))。此外,与单独用贝拉西普或阿巴西普孵育的T细胞相比,用抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合孵育T细胞产生更低的细胞数目(图23A-23D)。观察到用抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合处理使增殖的T细胞数目减少到几乎为零(参见图23A-23D,示出了7天或10天MLR后的平均VPD450高/低T细胞计数+SD (n=6))。还观察到在第10天有更多的重复孔(并未比较天数之间的绝对细胞计数)(图23A-23D)。此外,与单独用贝拉西普或阿巴西普孵育的T细胞相比,用抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合孵育T细胞产生更低的CD2和CD28水平(参见图24A-24D,示出了7天MLR后T细胞上的平均CD2/CD28中值FI+SD (n=6))。图24A-24D显示抗CD2抗体1下调CD2。图24A-24D显示,在具有高[CTLA4-Ig]的样品中的VPD450低T细胞展示出相对高的CD2 MFI,并且在具有高[抗CD2抗体1]的样品中的VPD450高T细胞上的CD28 MFI停留在~基线。

[0524] 在图25A-25F中示出了在细胞与对照、抗CD2抗体1、贝拉西普、阿巴西普、抗CD2抗

体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合一起孵育后使用紫色增殖染料450 (VPD450) 低T细胞得到的流式细胞术图表。在图26A-26G中示出了在细胞与对照、抗CD2抗体1、贝拉西普、阿巴西普、抗CD2抗体1和贝拉西普的组合或抗CD2抗体1和阿巴西普的组合一起孵育后使用高紫色增殖染料450 (VPD450) T细胞得到的流式细胞术图表。

[0525] 还进行了Fc沉默抗CD2 (IgG4) 和贝拉西普或阿巴西普的组的实验(参见图27A-27D)。观察到Fc沉默抗CD2改善了对CD8⁺ T细胞增殖的抑制。图27A-27D示出了在七天或10天MLR后的平均CD4/CD8⁺ T细胞增殖+SD (N=6)。

[0526] 结论: 本实施例显示使用抗CD2抗体1和CTLA4-Ig (阿巴西普或贝拉西普) 的组合疗法在T细胞增殖的抑制方面具有累加效应。相反, 抗CD2抗体1和CTLA4-Ig在诱导对增殖的最大抑制的浓度下的组合消除了用抗CD2抗体1单一疗法时所见到的Treg富集。已经报道, 使用基于贝拉西普的方案使移植患者在移植后戒断免疫抑制药物会引起高频率的急性细胞同种异体移植物排斥。这可能部分源于未受贝拉西普影响的同种异体反应性CD28⁺-T细胞。本实施例显示, 将抗CD2抗体1和CTLA-4共刺激阻滞剂(例如, 贝拉西普) 组合可以更有效地预防抗同种异体移植物免疫, 同时使患者戒断免疫抑制。在可受益于抗CD2抗体1和CTLA-4共刺激阻滞剂(例如, 阿巴西普或贝拉西普) 的组合疗法的患者中的临床试验还可显示组合疗法的协同作用。器官移植接受者可以用抗CD2抗体1和CTLA-4共刺激阻滞剂(例如, 贝拉西普) 进行治疗, 目的是戒断传统免疫抑制并从而避免相关的副作用。另外, 患有自身免疫性疾病如新发1型糖尿病或风湿性关节炎的患者可以受益于抗CD2抗体1和CTLA4-Ig组合疗法。本实施例显示, 同时靶向CD2/CD58和CD28/B7共刺激途径的双重共刺激阻滞剂与单独靶向任一途径相比, 可以有助于更有效地阻抑自身免疫。

[0527] 6.8 实施例7: Fc沉默抗CD2抗体或其抗原结合片段与CTLA-4共刺激阻滞剂的组合疗法

[0528] 本实施例描述了Fc沉默抗CD2抗体或其抗原结合片段和CTLA-4共刺激阻滞剂的组合疗法在细胞增殖和活化中的作用。本实施例中使用的Fc沉默抗CD2抗体是: Fc沉默抗CD2 Ab-1 (例如, 在CHO细胞中表达的西利珠单抗); Fc沉默抗CD2 Ab-2 (例如, 具有两个突变(L234A/L235A)的西利珠单抗); Fc沉默抗CD2 Ab-3 (例如, 具有与Fc沉默抗CD2 Ab-2相同的两个突变并且还包含附加突变(P329G/L234A/L235A)的西利珠单抗); Fc沉默抗CD2 Ab-4 (例如, IgG2重链中的西利珠单抗CDR); Fc沉默抗CD2 Ab-5 (例如, IgG2重链中的西利珠单抗CDR和七个突变(V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S)); Fc沉默抗CD2 Ab-6 (例如, IgG4重链中的西利珠单抗CDR和一个突变(S228P)); Fc沉默抗CD2 Ab-7 (例如, IgG4重链中的西利珠单抗CDR和三个突变(P329G/S228P/L235E))。本实施例中使用的所有Fc沉默抗CD2抗体都具有相同的轻链。Fc沉默抗CD2 Ab1 (例如, 西利珠单抗; Fc沉默抗CD2 Ab-1 IgG1) 是通过将众所周知的LALA-PG突变引入西利珠单抗中的等效位点生成的 (Arduin E, Arora S, Bamert PR, Kuiper T, Popp S, Geisse S等人, Highly reduced binding to high and low affinity mouse Fc gamma receptors by L234A/L235A and N297A Fc mutations engineered into mouse IgG2a. Mol Immunol (2015) 63:456-63. doi:10.1016/j.molimm.2014.09.017; Lo DJ, Weaver TA, Stempora L, Mehta AK, Ford ML, Larsen CP等人, Selective targeting of human alloresponsive CD8 effector memory T cells based on CD2 expression. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc

Transpl Surg (2011) 11:22.doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03317.x)。Fc沉默抗CD2Ab-5是通过在标准IgG2框架中的等效位点处引入以下突变生成的:V234A、G237A P238S、H268A、V309L、A330S、P331S(Wang X,Mathieu M,Brezski RJ.IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions.Protein Cell(2018)9:63-73.doi:10.1007/s13238-017-0473-8)。Fc沉默抗CD2 Ab-7是通过在标准IgG4框架中的等效位点引入以下突变生成的:S228P、L235E、P329G(Silva J-P,Vetterlein O,Jose J,Peters S,Kirby H.The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation.J Biol Chem(2015) 290:5462-9.doi:10.1074/jbc.M114.600973;Schlothauer T,Herter S,Koller CF,Grau-Richards S,Steinhart V,Spick C等人,Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions.Protein EngDes Sel(2016) 29:457-66.doi:10.1093/protein/gzw040)。

[0529] 基于细胞的Fc γ R结合测定:简言之,测试不同浓度的抗体(抗CD2抗体(或西利珠单抗);Fc沉默抗CD2 Ab-1;Fc沉默抗CD2 Ab-2;Fc沉默抗CD2 Ab-3;Fc沉默抗CD2 Ab-4;Fc沉默抗CD2 Ab-5;Fc沉默抗CD2 Ab-6;和Fc沉默抗CD2 Ab-7)与Fc γ RI、Fc γ RIIA和Fc γ RIIIA结合的能力(参见图28)。用于Fc γ RI和Fc γ RIIIA结合测定的最高浓度为1 μ g/mL/6.67nM并且对于Fc γ RIIA结合测定而言为100 μ g/mL/667nM(参见图28和表36)。

[0530] 表36:基于细胞的Fc γ R结合测定

	抗体剂	Fc γ R 结合和信号传导		
		Fc γ RI	Fc γ RIIA	Fc γ RIIIA
[0531]	抗 CD2 抗体	0.0326	5.3100	0.0520
	Fc 沉默抗 CD2 Ab-1	0.0306	0.1415	0.0108
	Fc 沉默抗 CD2 Ab-2	0.0042	0.3102	0.0862
	Fc 沉默抗 CD2 Ab-3	N/A	N/A	N/A
	Fc 沉默抗 CD2 Ab-4	0.0589	0.2505	0.1426
	Fc 沉默抗 CD2 Ab-5	N/A	N/A	N/A
	Fc 沉默抗 CD2 Ab-6	0.0245	0.3496	0.3236
	Fc 沉默抗 CD2 Ab-7	N/A	N/A	N/A

[0532] 同种异体混合淋巴细胞反应(MLR):简言之,将来自两个供体的外周血单个核细胞(PBMC)混合在PBS中,浓度为1.5-2.0 $\times 10^7$ 个细胞/mL,并且用紫色增殖染料450(VPD450;BD Biosciences, San Diego, USA)按照制造商的方案染色。本实施例使用双向同种异体MLR,即来自两个供体的PBMC均未经由辐照/化学处理进行灭活。因此,来自两个供体的PBMC都起到了应答子和刺激子的作用。

[0533] 将VPD450染色的PBMC洗涤并重悬于在AIM V培养基(Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)中的10%热灭活FBS(Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)中。将重悬的PBMC分配到圆底96孔细胞培养板(用于流式细胞术)并且添加纯培养基(无抗体对照)或补充有Fc沉默抗CD2抗体(Fc沉默抗CD2Ab-5或Fc沉默抗CD2

Ab-7) 和/或阿巴西普或贝拉西普的培养基至最终浓度为 2×10^6 个细胞/mL (最终体积200 μ L)。将MLR在37℃、5%CO₂下分别孵育七天和十天。第六天,向每个孔添加100 μ L新鲜培养基(无附加抗体)。第八天,在不干扰细胞沉淀的情况下从每个孔中吸出100 μ L培养基,并以100 μ L新鲜培养基替换。

[0534] 对于第一轮实验,用于Fc沉默抗CD2 Ab-5或Fc沉默抗CD2 Ab-7滴定的抗体浓度介于67.2nM至0.67nM之间(10倍连续稀释)。在所有连续稀释步骤中,添加有CTLA4-Ig的Fc沉默抗CD2 Ab-5和Fc沉默抗CD2 Ab-7滴定补充有433.4nM贝拉西普。用于贝拉西普单一疗法滴定的浓度介于433.4nM至0.0043nM之间(10倍连续稀释)(参见图29A、图29B、图30A、图30B、图31A和图31B)。

[0535] 对于第二轮实验,用于Fc沉默抗CD2 Ab-7滴定的抗体浓度介于10 μ g/mL至50.8pg/mL之间(3倍连续稀释)。在所有连续稀释步骤中,添加有CTLA4-Ig的Fc沉默抗CD2 Ab-7滴定补充有100 μ g/mL阿巴西普或贝拉西普。用于阿巴西普/贝拉西普滴定的融合蛋白浓度介于100 μ g/mL至0.1pg/mL之间(10倍连续稀释)(参见图32A-32B)。

[0536] 流式细胞术:在七天的MLR之后,将样品用Fc受体结合抑制剂(Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)封闭,然后用抗CD3 VioGreen(克隆REA613; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany)、抗CD45RA BV650(克隆HI100; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CD2 BV786(克隆RPA-2.10; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CD8 BB550(克隆RPA-T8; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CD56 PE(克隆REA196; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany)、抗HLA-DR PerCP-Cy5.5(克隆G46-6; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CCR7 APC(克隆G43H7; BD Biosciences, San Diego USA)和抗CD4 APC-Vio770(克隆REA623; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany)进行染色(参考图32A)。将T细胞作为CD3+CD56-门控。在十天的MLR之后,将样品用Fc受体结合抑制剂(Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)封闭,然后用抗CD45RA BV650(克隆HI100; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CD3 BV786(克隆SK7; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CD8 BB550(克隆RPA-T8; BD Biosciences, San Diego USA)、抗FoxP3 PE(克隆236A/E7; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CD127 PerCP-Cy5.5(克隆HIL-7R-M21(BD Biosciences, San Diego USA); 或A019D5(Biolegend, Sunnyvale USA))、抗CCR7 APC(克隆G43H7; BD Biosciences, San Diego USA)、抗CD25 Alexa Fluor 700(克隆M-A251; BD Biosciences, San Diego USA)和抗CD4APC-Vio770(克隆REA623; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany)进行染色(参考图32B)。将T细胞作为CD3+门控。使用VPD450(VPD450高:未增殖的; VPD450低:增殖的)评估细胞增殖。将样品在4℃下在黑暗中染色,并且在盐水溶液中洗涤两次,接着使用BD Celesta流式细胞仪(BD Biosciences, San Diego USA)进行采集。

[0537] 结果:为了评估将Fc沉默抗CD2抗体和贝拉西普组合的抑制作用,在七天和十天的MLR之后经由流式细胞术评估T细胞增殖。如图29A和29B的右侧图所示,与单一疗法或未处理的对照相比,Fc沉默抗CD2 Ab-5和贝拉西普的组合诱导CD8 T细胞增殖减少。此外,Fc沉默抗CD2 Ab-5和贝拉西普的组合引起T细胞活化减少,如通过标志物CD69和HLA-DR所测量的(图31A)。在IgG4 Fc沉默抗CD2抗体Fc沉默抗CD2 Ab-7和贝拉西普的情况下,组合疗法诱导CD8 T细胞增殖(图30A和30B)和T细胞活化(图31B)的减少。

[0538] 在更宽的稀释范围 (介于10 μ g/mL至50.8pg/mL之间) 与100 μ g/mL阿巴西普或贝拉西普组合以Fc沉默抗CD2 Ab-7滴定进行的其他研究与单一疗法或未治疗的对照相比,诱导CD8 T细胞增殖减少 (图32A和32B的右侧图)。

[0539] 序列

[0540]

SEQ ID NO	描述	序列
1	重链可变区	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFT EYYMYWVRQAPGQGLELVGRIDPEDGSID YVEKFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSD TAVYYCARGKFNYRFAYWGQGTLLTVSS
2	轻链可变区	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHS SGNTYLNWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGV PDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGVYYC MQFTHPYTFGQGTKLEIK
3	重链可变区 CDR 1	EYYMY
4	重链可变区 CDR 2	RIDPEDGSIDYVEKFKK

SEQ ID NO	描述	序列
5	重链可变区 CDR 3	GKFNYRFAY
6	轻链可变区 CDR 1	RSSQSLLHSSGNTYLN
7	轻链可变区 CDR 2	LVSKLES
8	轻链可变区 CDR 3	MQFTHYPYT
9	重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL HSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNIFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0541]

[0542]

SEQ ID NO	描述	序列
12	重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	轻链恒定区	RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
15	轻链恒定区	RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
16	优化的重链序列	CAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCTG AGGTGCAGAGACCCGGCGCCAGCGTCAA GGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACATC TTCACAGAATACTACATGTACTGGGTGAG GCAAGCCCCCGGCCAAGGACTGGAGCTG GTGGGCAGAATCGATCCAGAGGATGGCA GCATCGACTACGTGGAGAAGTTCAAGAA

[0543]

SEQ ID NO	描述	序列
		GAAGGTGACTCTGACAGCCGACACAAGC AGCAGCACTGCTTACATGGAGCTGAGCTC TCTGACTAGCGATGACACTGCCGTGTACT ACTGTGCTAGGGGGCAAGTTCAACTATAGG TTCGCCTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGT GACAGTCAGCAGCGCTAGCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAG GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTC CCGGCCGTCTTACAGTCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAGGTTGAGCCCAAA TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA CCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCC AAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCTTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG

[0544]

SEQ ID NO	描述	序列
		GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAT GA
17	优化的轻链序列	GACGTGGTGATGACTCAGAGCCCTCCTTC TCTGCTGGTGACTCTGGGCCAGCCAGCCA GCATCAGCTGTAGGAGCAGCCAGTCTCTG CTGCACTCCAGCGGCAACACTTATCTGAA CTGGCTGCTGCAGAGACCCGGCCAGAGC CCTCAGCCTCTGATCTACCTCGTGAGCAA GCTGGAGAGCGGCGTGCCAGATAGGTTT AGCGGCAGCGGAAGCGGCACTGACTTCA CTCTGAAGATCAGCGGCGTGGAAGCTGA GGATGTGGGCGTCTACTACTGCATGCAGT TCACACACTACCCATACACTTTCGGCCAAG GCACAAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGT GGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACT CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA CCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGATG A
18	CH2 结构域	SVFLFPPKPKD'TLMISRTPEVTCVVVDVSAE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKTK
19	CH2 结构域	SVFLFPPKPKD'TLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLGSSIEKTISKAK
20	CH3 结构域	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK

[0545]

SEQ ID NO	描述	序列
		GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT*TPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
21	CH3 结构域	GQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT*TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	贝拉西普	MHVAQPAVVLASSRGIAFVCEYASPGKYTE VRVT*VLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYI CKVELMYPPPYEGIGNGTQIYVIDPEPCPD SDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLF PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
23	阿巴西普	MGVLLTQRTLLSLVLALLFSPMASMAMHVA QPAVVLASSRGIAFVCEYASPGKATEVRVT VLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLLDDSI CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVE LMYPPPYLGLIGNGTQIYVIDPEPCPDSDQEP KSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT*TPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS

序列表

<110> 泽拉里翁马耳他有限公司(Zelarion Malta Limited)

<120> 抗CD2抗体

<130> 105715PC

<140> TBA

<141> 2021-06-22

<150> 63/182,095

<151> 2021-04-30

<150> 63/135,381

<151> 2021-01-08

<150> 63/042,844

<151> 2020-06-23

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重链可变区

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Gln Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Glu Tyr

20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Leu Val

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Ser Ile Asp Tyr Val Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Lys Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Lys Phe Asn Tyr Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 轻链可变区
 <400> 2
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Leu Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Pro Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Glu Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Phe
 85 90 95
 Thr His Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 重链可变区CDR 1
 <400> 3

Glu Tyr Tyr Met Tyr
 1 5
 <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 重链可变区CDR 2
 <400> 4

Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Ser Ile Asp Tyr Val Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Lys

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 重链可变区CDR 3
<400> 5
Gly Lys Phe Asn Tyr Arg Phe Ala Tyr
1 5
<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 轻链可变区CDR 1
<400> 6
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15
<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 轻链可变区CDR 2
<400> 7
Leu Val Ser Lys Leu Glu Ser
1 5
<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 轻链可变区CDR 3
<400> 8
Met Gln Phe Thr His Tyr Pro Tyr Thr
1 5
<210> 9
<211> 330
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重链恒定区

<400> 9

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5				10						15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50				55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85							90				95	
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100						105					110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115					120						125	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			130				135							140	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165							170				175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185						190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195				200							205	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			210				215							220	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235					240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245							250				255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260							265				270	
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe

275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		320
325	330	
<210> 10		
<211> 330		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 重链恒定区		
<400> 10		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		15
20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		80
85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		

195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	

<210> 11

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重链恒定区

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		

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

<210> 12

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重链恒定区

<400> 12

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		

35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	
<210> 13		
<211> 330		

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重链恒定区

<400> 13

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50				55					60			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90						95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115				120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			130				135					140			
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150				155					160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165					170						175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Ser	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195				200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			210				215					220			
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230				235					240	
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245					250						255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265						270	

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 14
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 轻链恒定区
 <400> 14

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

<210> 15
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 轻链恒定区
 <400> 15

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

	20		25		30	
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val
	35		40		45	
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser
	50		55		60	
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr
65			70		75	
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys
	85		90		95	
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
	100		105			
<210>	16					
<211>	1350					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(Artificial Sequence)					
<220>						
<223>	优化的重链序列					
<400>	16					
caagtgcagc	tggtgcagag	cggagctgag	gtgcagagac	ccggcgccag	cgtaaggtg	60
agctgtaagg	ccagcggcta	catcttcaca	gaatactaca	tgtactgggt	gaggcaagcc	120
cccgcccaag	gactggagct	ggtgggcaga	atcgatccag	aggatggcag	catcgactac	180
gtggagaagt	tcaagaagaa	ggtgactctg	acagccgaca	caagcagcag	caactgcttac	240
atggagctga	gctctctgac	tagcgatgac	actgccgtgt	actactgtgc	taggggcaag	300
ttcaactata	ggttcgccta	ctggggccaa	ggcactctgg	tgacagtcag	cagcgctagc	360
accaagggcc	catcggctct	ccccctggca	ccctcctcca	agagcacctc	tgggggcaca	420
gcggccctgg	gctgcctggt	caaggactac	ttccccgaac	cggtgacggt	gtcgtggaac	480
tcaggcgccc	tgaccagcgg	cgtgcacacc	ttccggcgcc	tcctacagtc	ctcaggactc	540
tactccctca	gcagcgtggt	gaccgtgccc	tccagcagct	tgggcaccca	gacctacatc	600
tgcaacgtga	atcacaagcc	cagcaacacc	aaggtggaca	agaaggttga	gccccaatct	660
tgtgacaaaa	ctcacacatg	cccaccgtgc	ccagcacctg	aactcctggg	gggaccgtca	720
gtcttctctt	tcccccaaaa	acccaaggac	acctcatga	tctcccgga	ccctgagggtc	780
acatgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gacctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	840
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	900
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtac	960
aagtgcaagg	tctccaacaa	agccctccca	gcccccatcg	agaaaacat	ctccaaagcc	1020
aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	acctgcccc	catcccgga	cgagctgacc	1080
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	1140
gagtgaggga	gcaatgggca	gccggagaac	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	1200
tccgacggct	ccttcttctt	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	1260

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg taaatgatga 1350

<210> 17

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 优化的轻链序列

<400> 17

gacgtggtga tgactcagag ccctccttct ctgctggtga ctctgggcca gccagccagc 60
atcagctgta ggagcagcca gtctctgctg cactccagcg gcaacactta tctgaactgg 120
ctgctgcaga gacccggcca gagccctcag cctctgatct acctcgtgag caagctggag 180
agcggcgtgc cagataggtt tagcggcagc ggaagcggca ctgacttcac tctgaagatc 240
agcggcgtgg aagctgagga tgtgggcgtc tactactgca tgcagttcac aactaccca 300
tacactttcg gccaaaggcac aaagctggaa atcaagcgta cgggtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcacc cagcgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcacccatc agggcctgag ctgccccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660
tga 663

<210> 18

<211> 102

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CH2结构域

<400> 18

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
1 5 10 15
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp
20 25 30
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
35 40 45
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
50 55 60
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
65 70 75 80
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys

	85	90	95
Thr Ile Ser Lys Thr Lys			
100			
<210> 19			
<211> 102			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> CH2结构域			
<400> 19			
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
1 5 10 15			
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp			
20 25 30			
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
35 40 45			
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
50 55 60			
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
65 70 75 80			
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Gly Ser Ser Ile Glu Lys			
85 90 95			
Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
100			
<210> 20			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> CH3结构域			
<400> 20			
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu			
1 5 10 15			
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
20 25 30			
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
35 40 45			
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
50 55 60			

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CH3结构域

<400> 21

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

<210> 22

<211> 356

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 贝拉西普

<400> 22

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val
 20 25 30
 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35						40						45							
Ala	Ala	Thr	Tyr	Met	Met	Gly	Asn	Glu	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	Ser				
50						55						60							
Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln				
65						70						75						80	
Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Glu	Leu				
85						90						95							
Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile				
100						105						110							
Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Gln	Glu	Pro	Lys				
115						120						125							
Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu				
130						135						140							
Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr				
145						150						155						160	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val				
165						170						175							
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val				
180						185						190							
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser				
195						200						205							
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu				
210						215						220							
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala				
225						230						235						240	
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro				
245						250						255							
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln				
260						265						270							
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala				
275						280						285							
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr				
290						295						300							
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu				
305						310						315						320	
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val				
325						330						335							
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu				
340						345						350							

Ser Pro Gly Lys

355

<210> 23

<211> 360

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 阿巴西普

<400> 23

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala

1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro

20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu

35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg

50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met

65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser

85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp

100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr

115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu

130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His

145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val

165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

225 230 235 240

Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
				245				250				255			
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				260				265				270			
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
				275				280				285			
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
				290				295				300			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
305				310				315				320			
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				325				330				335			
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				340				345				350			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser								
355				360											

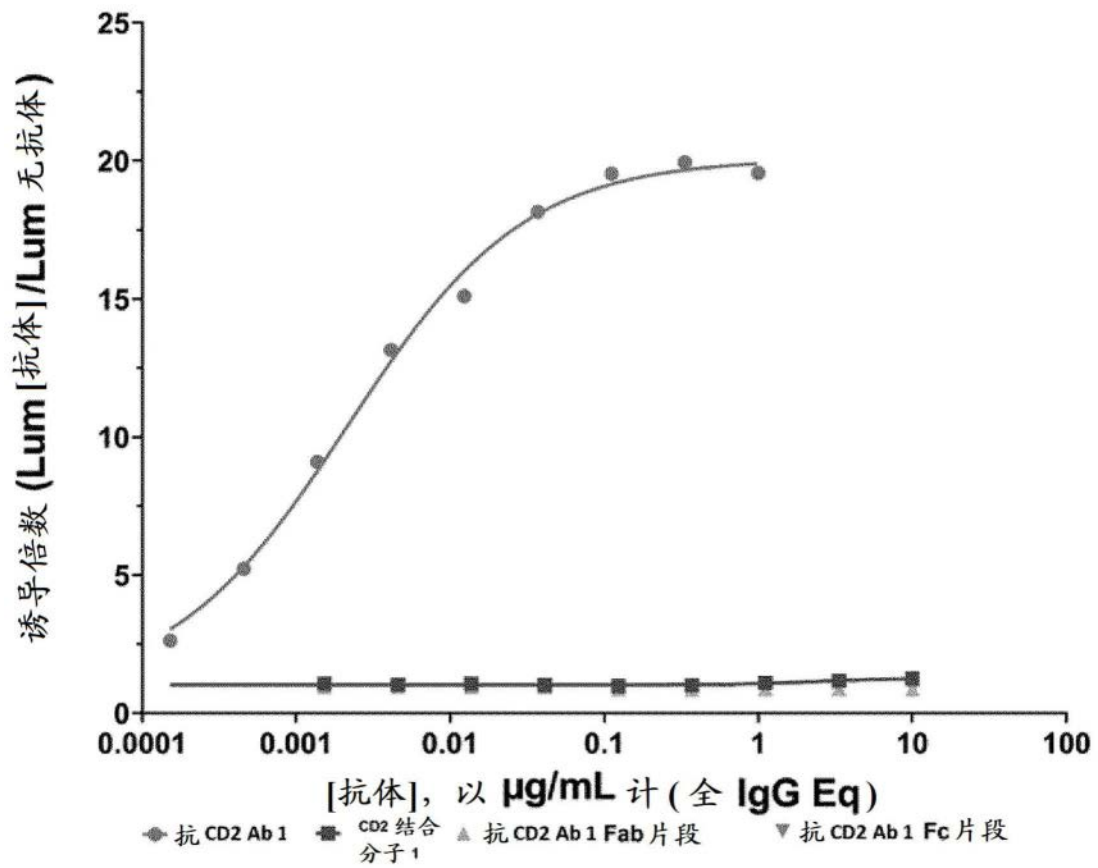


图1

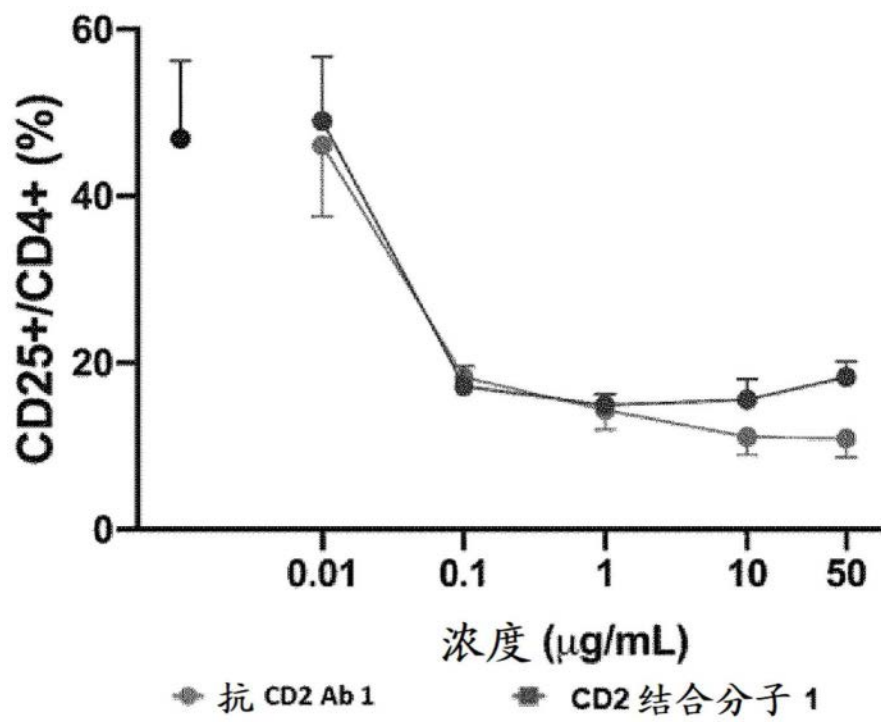


图2A

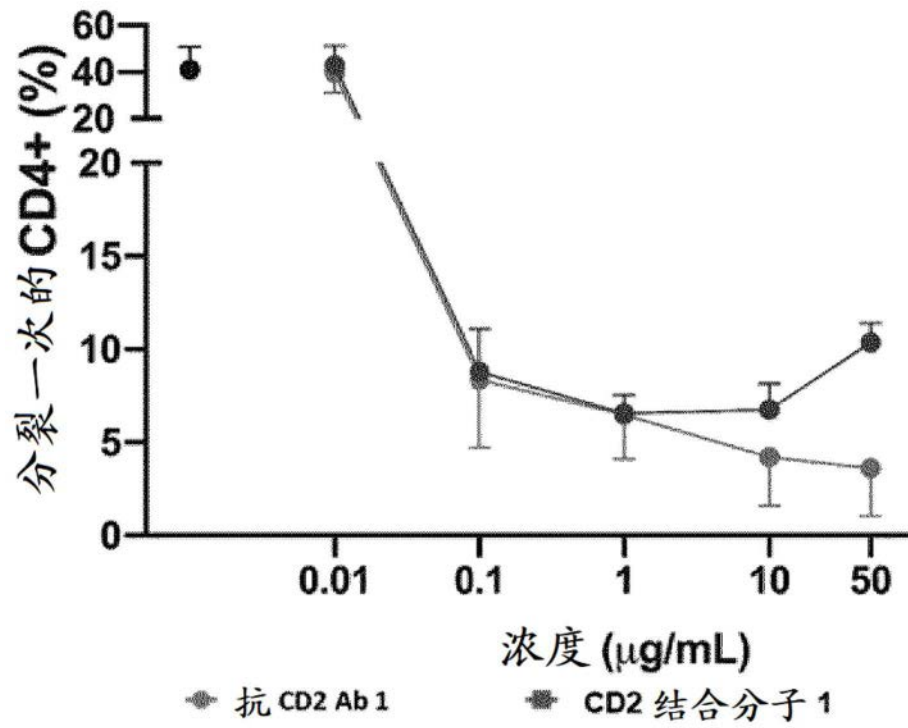


图2B

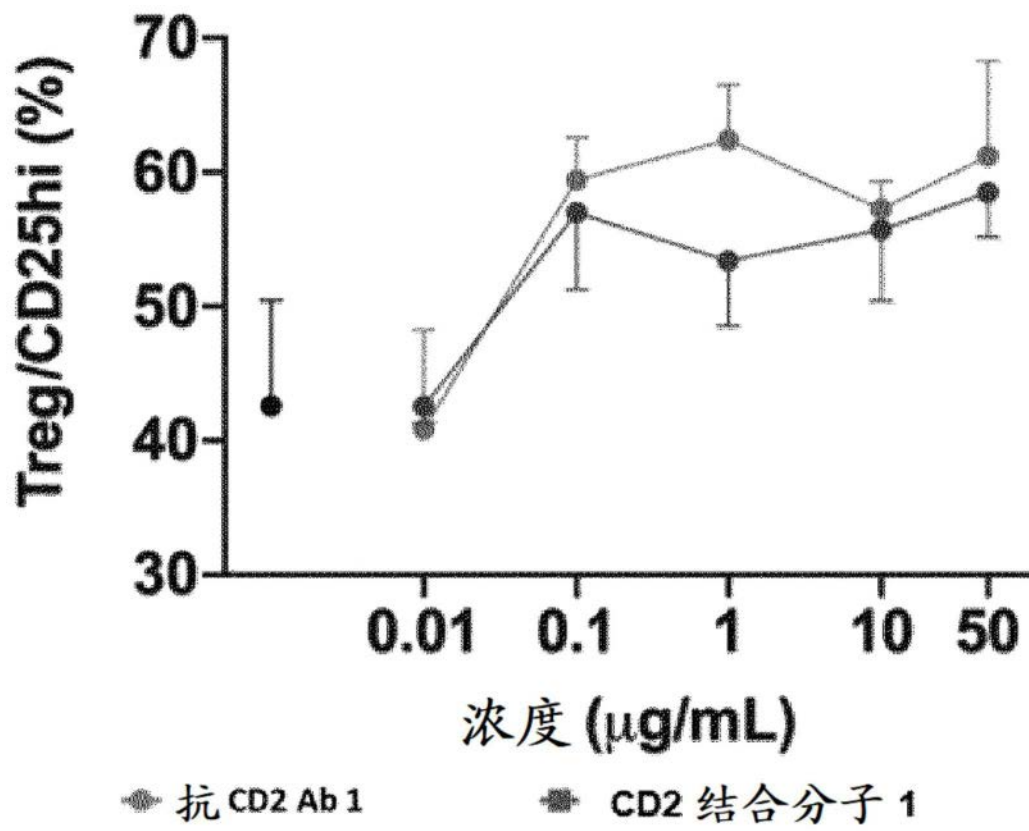


图3

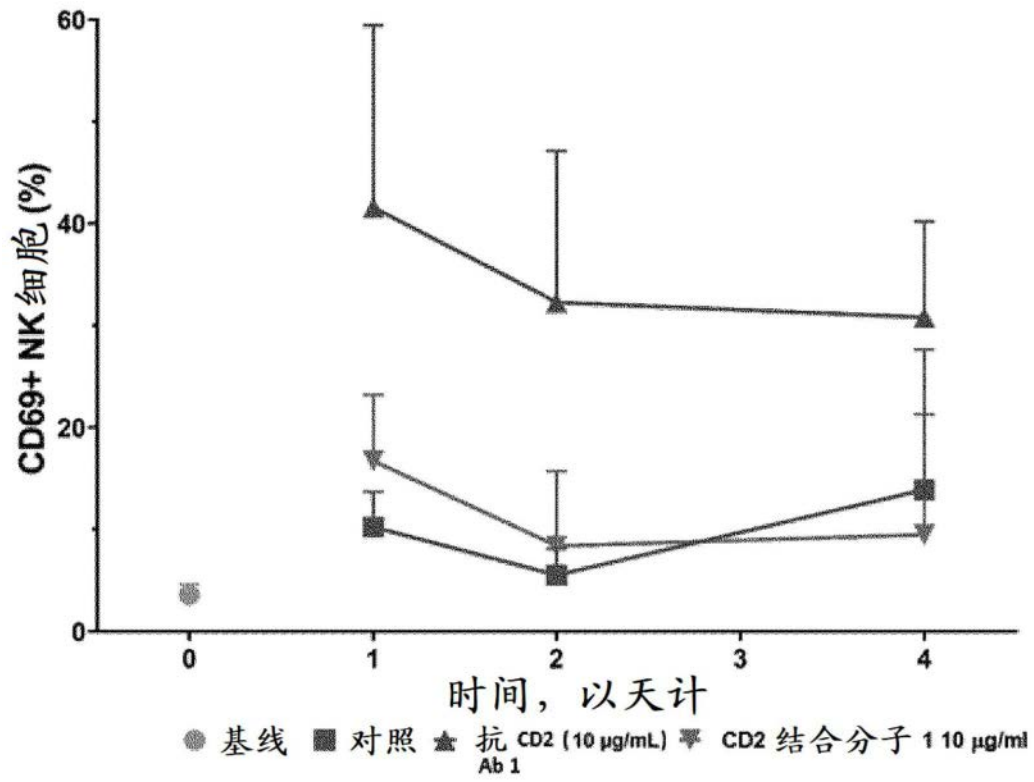


图4A

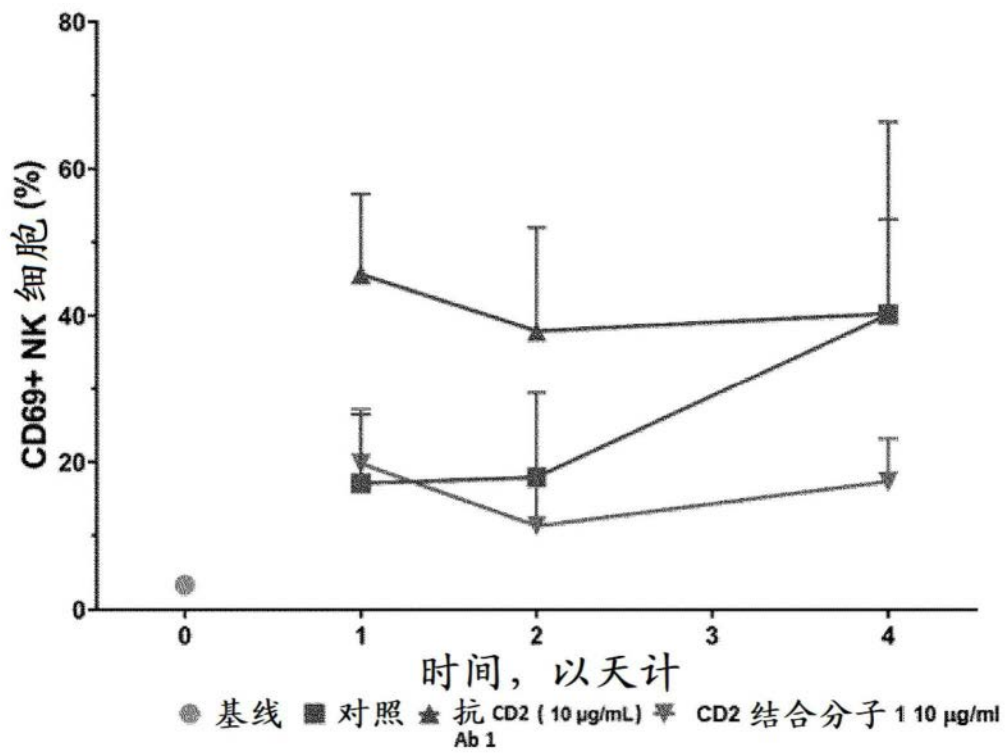


图4B

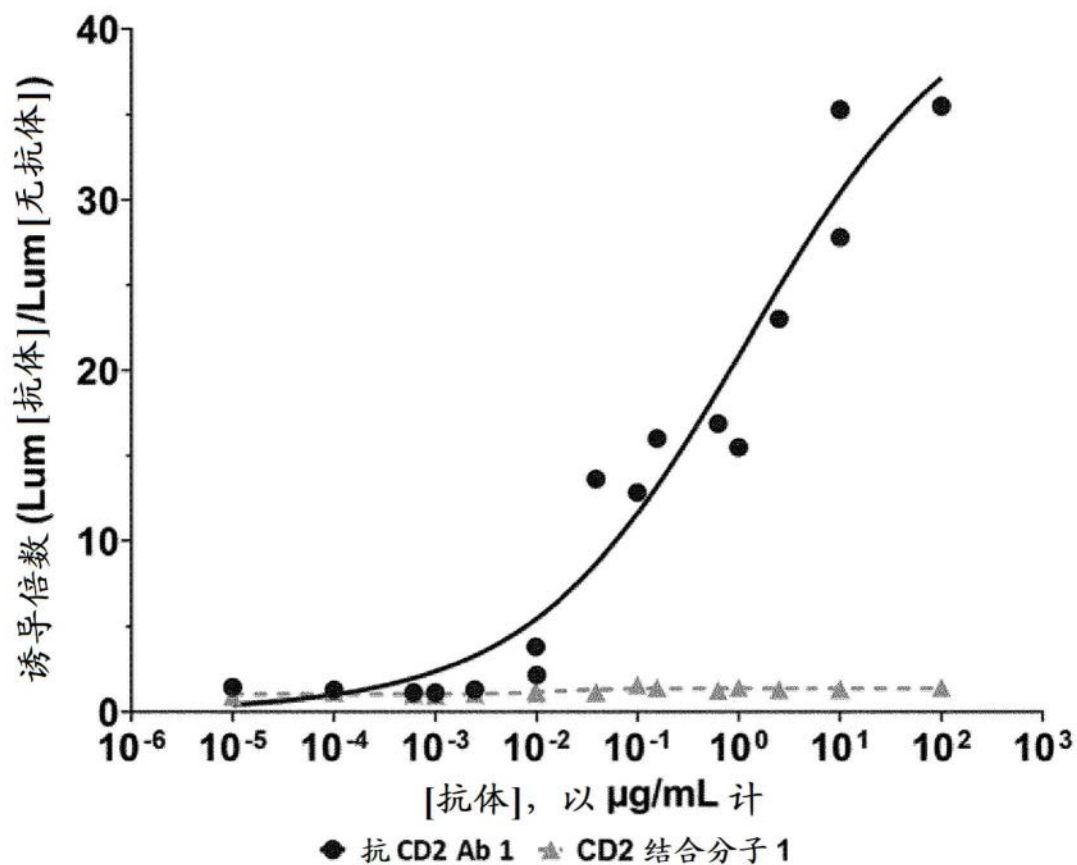


图5

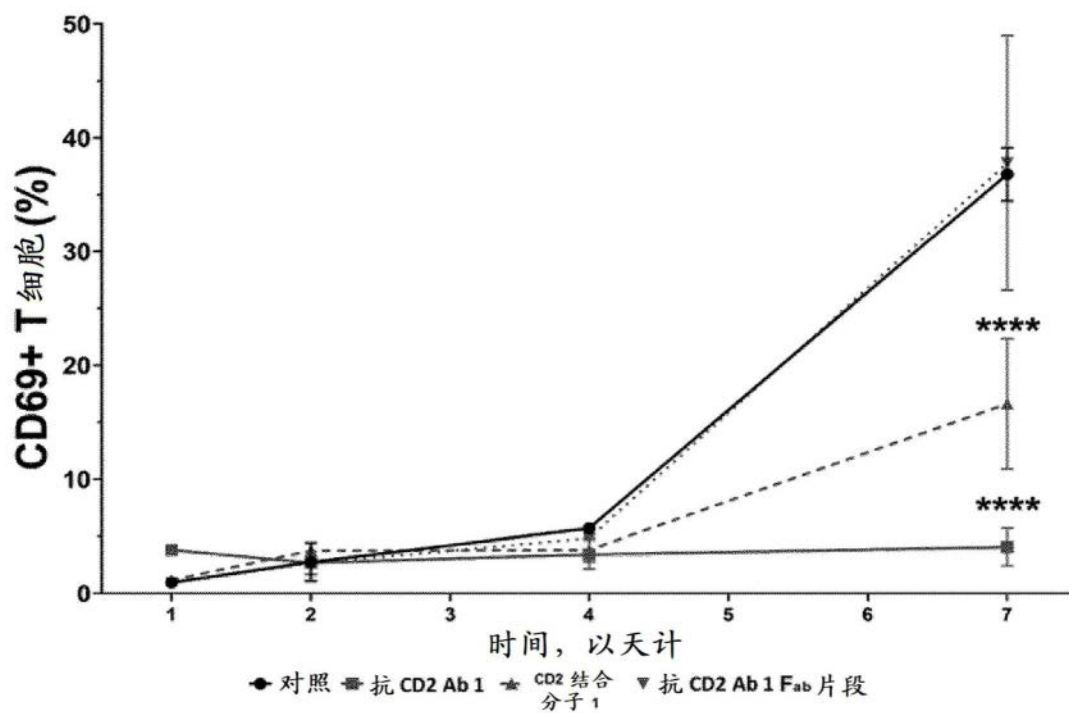


图6

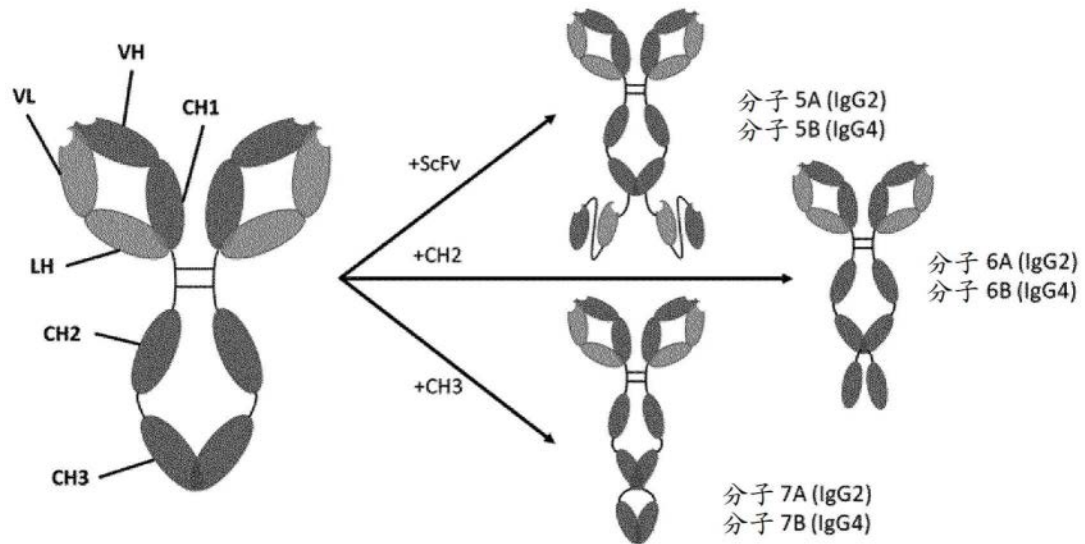


图7

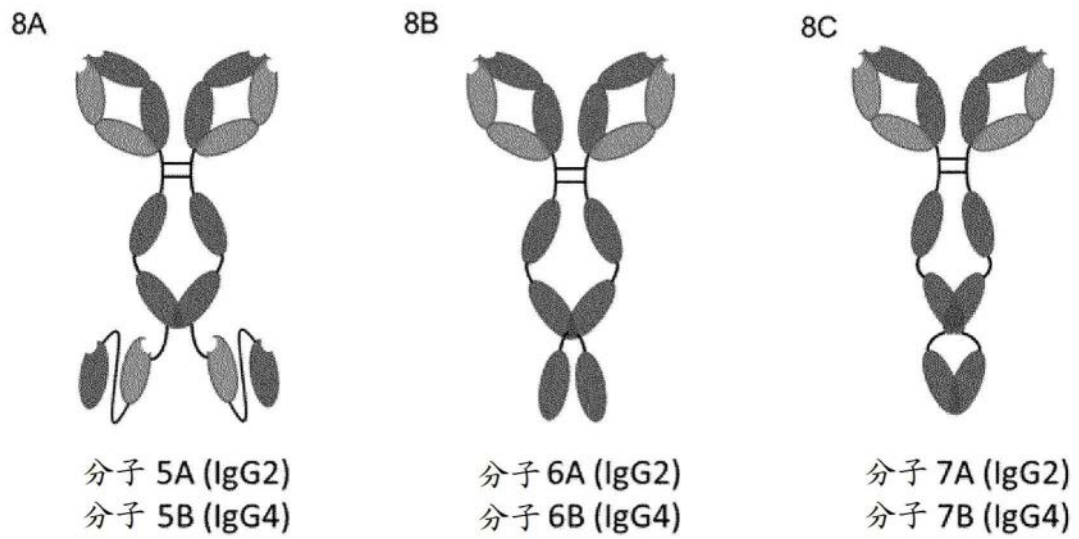


图8

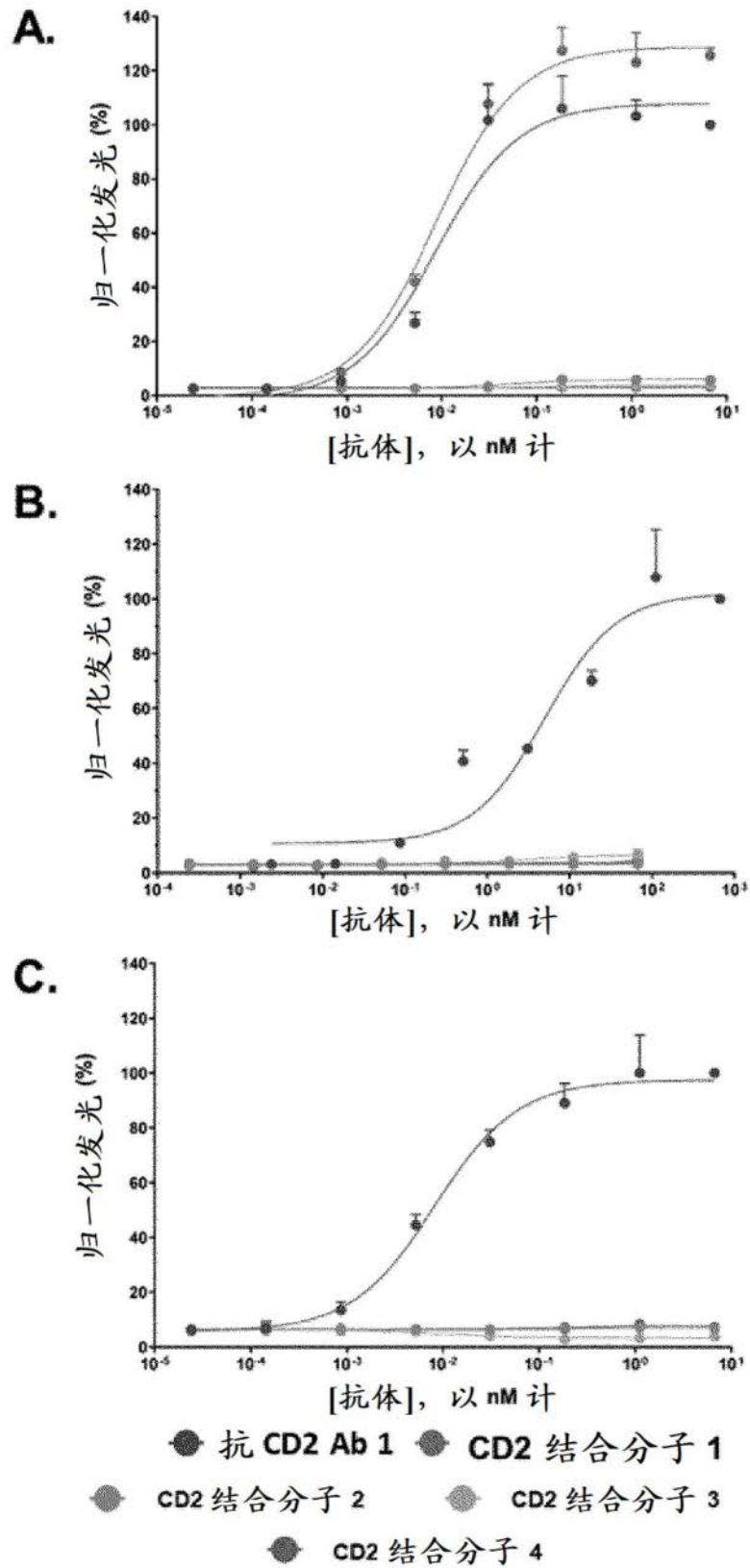


图9

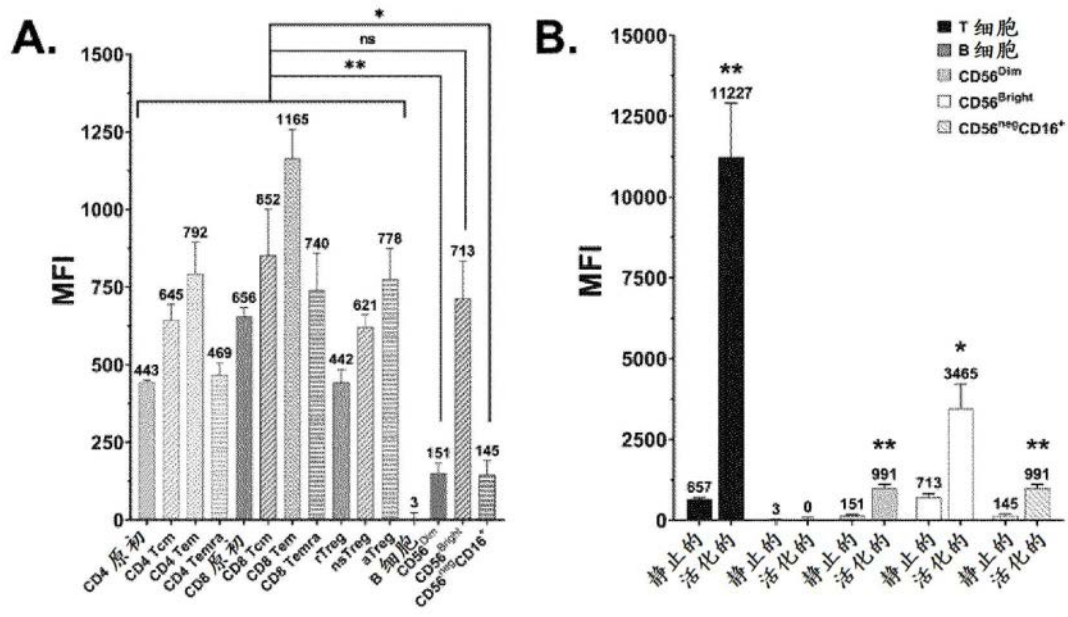


图10

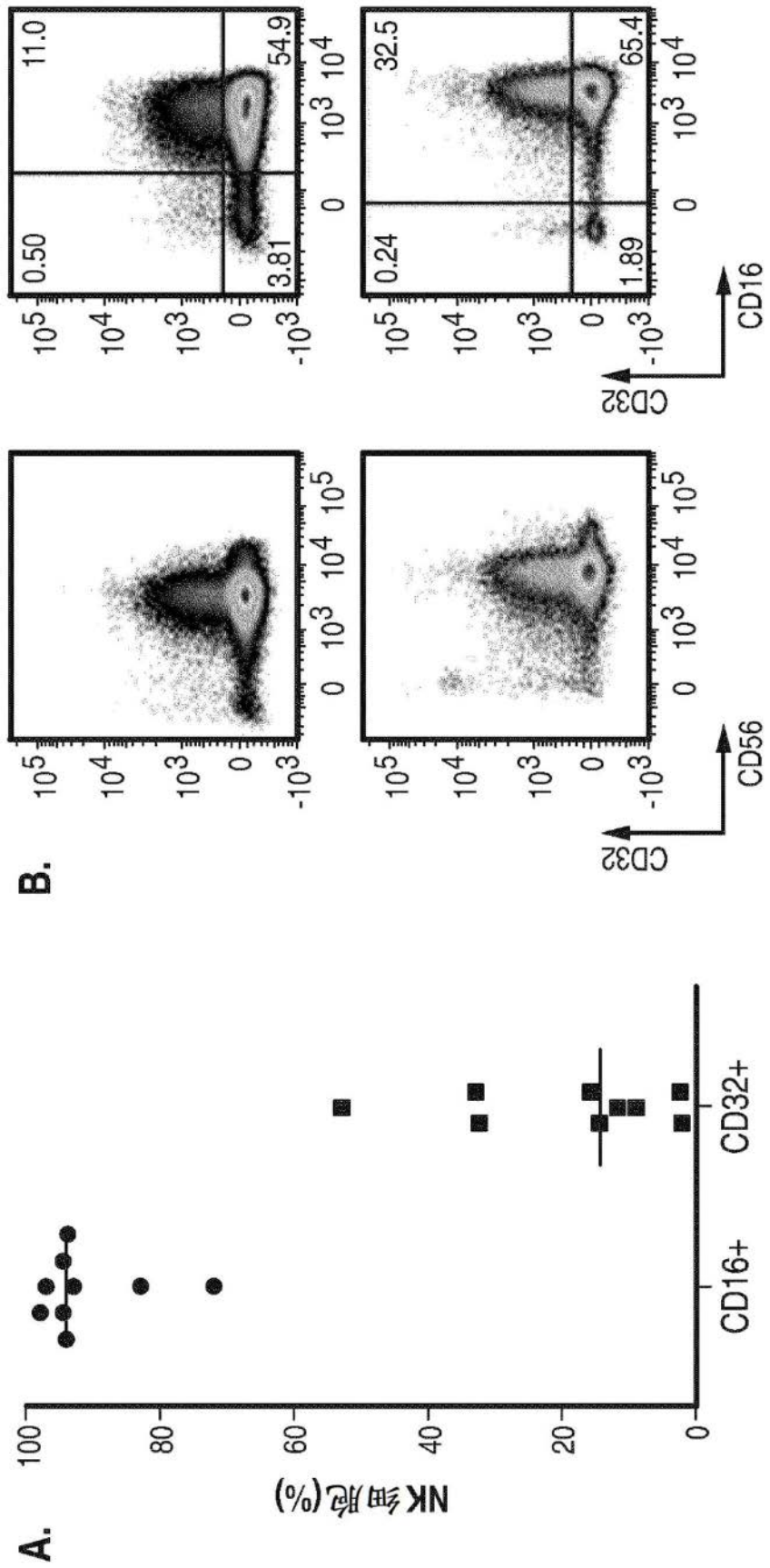


图11

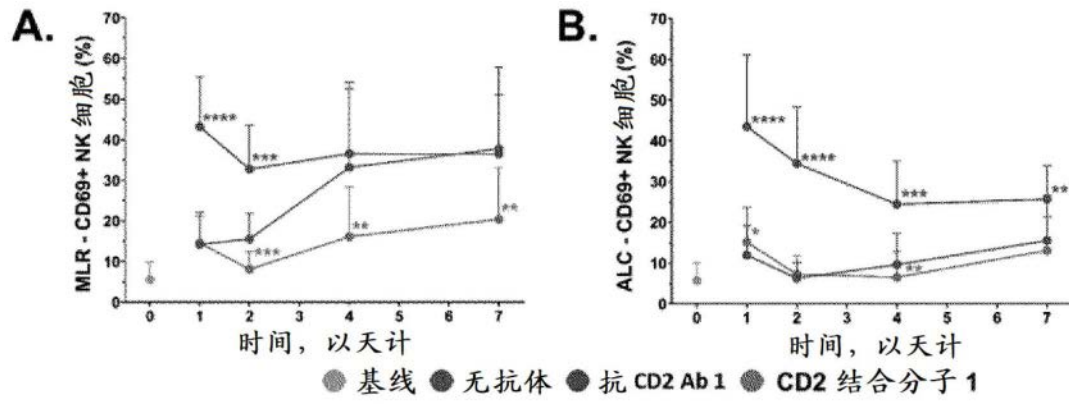


图12

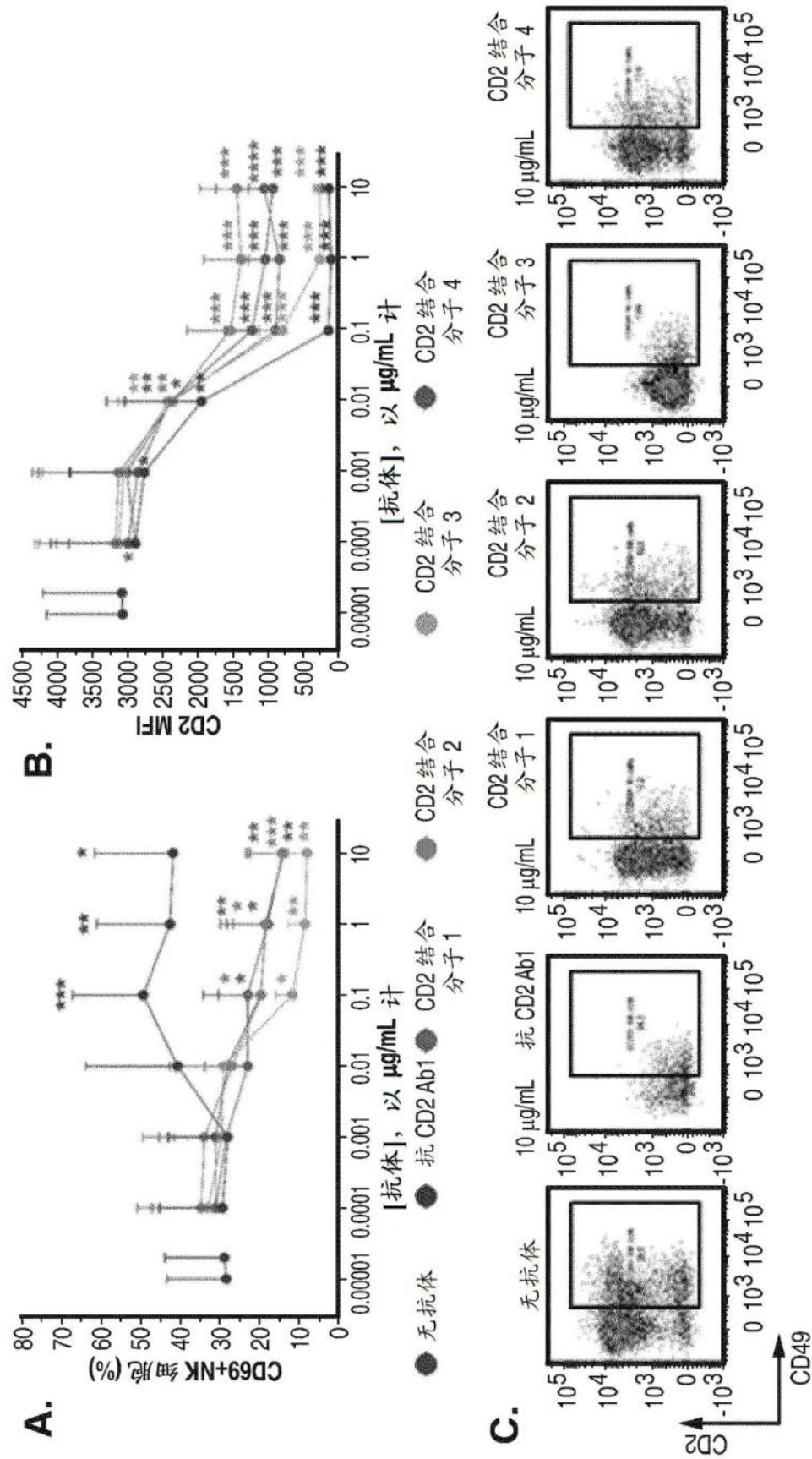


图13

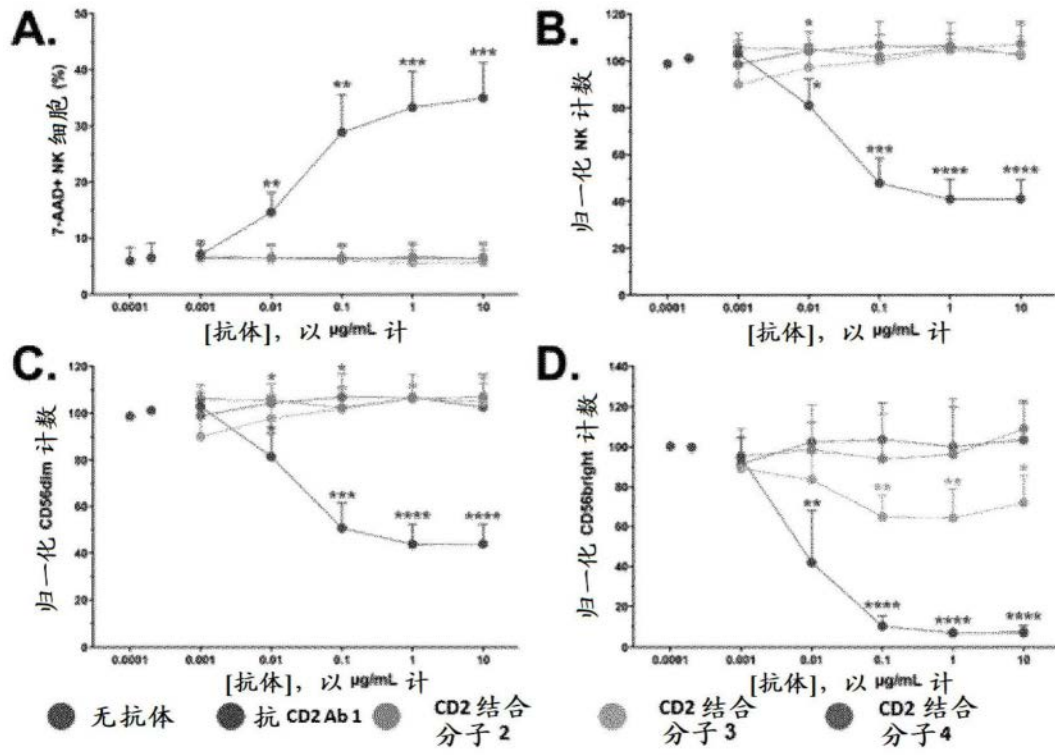


图14

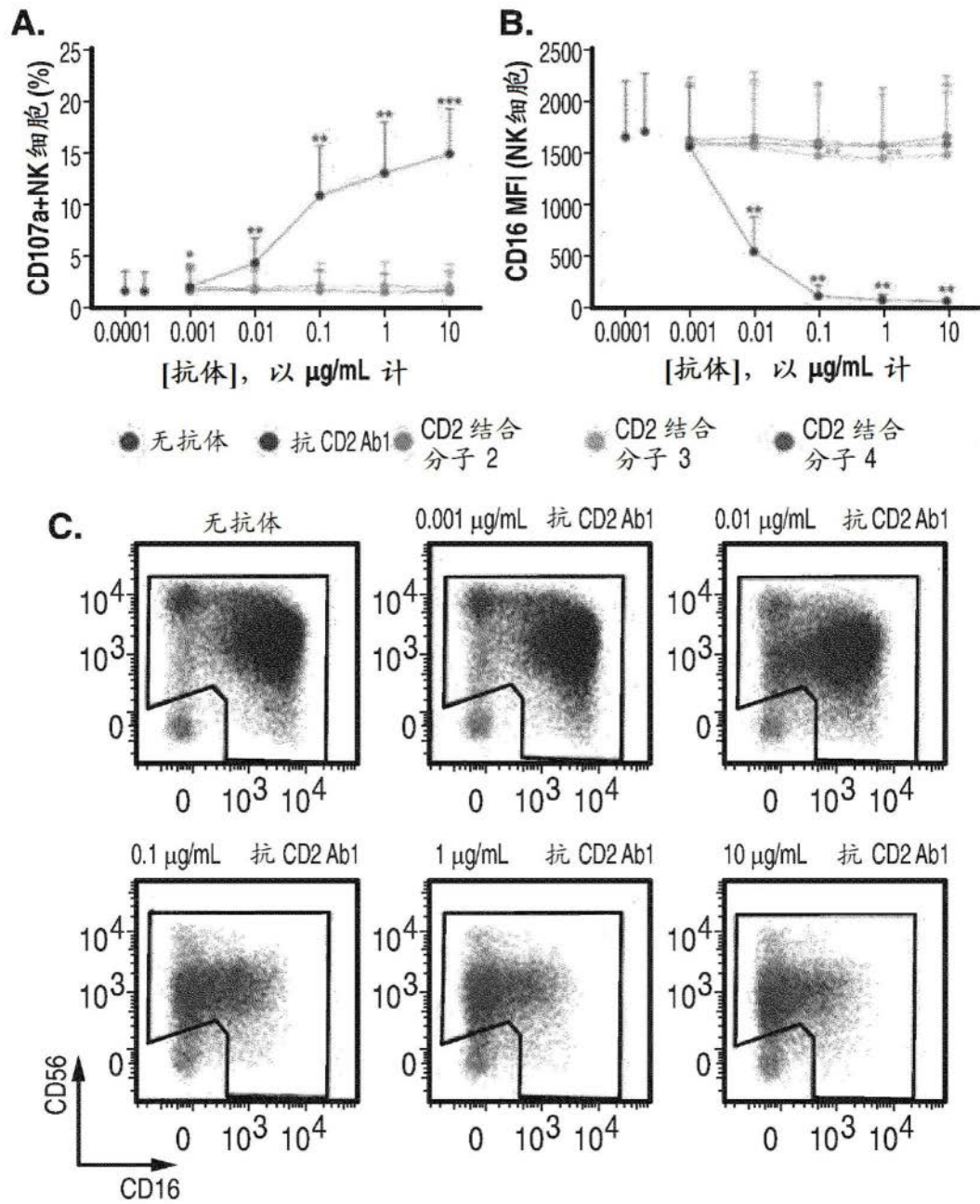


图15

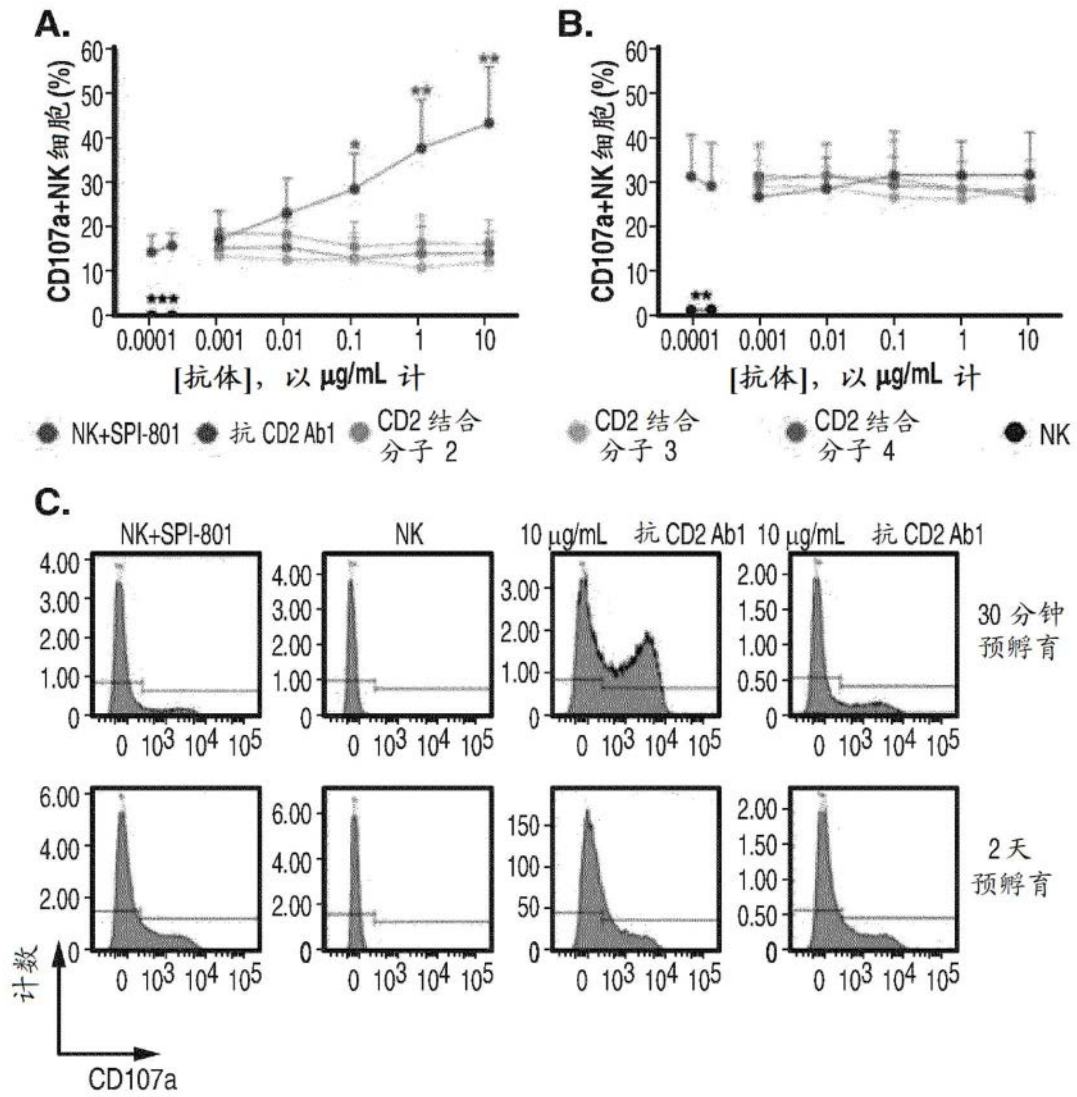


图16

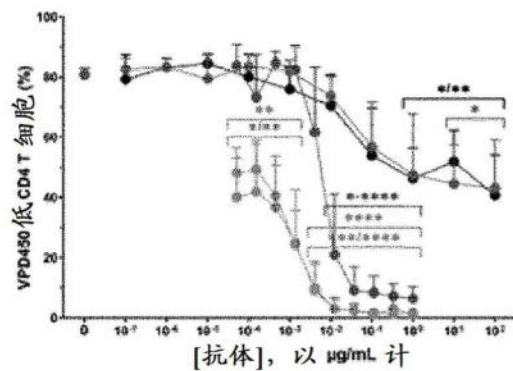


图 18A

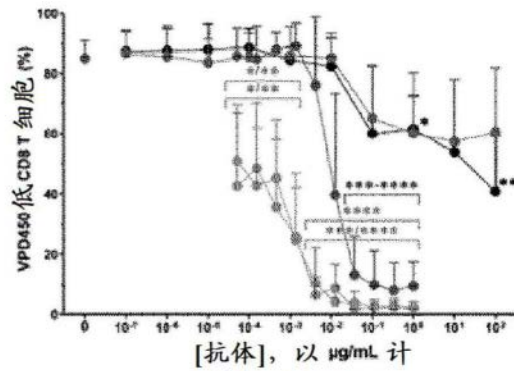


图 18B

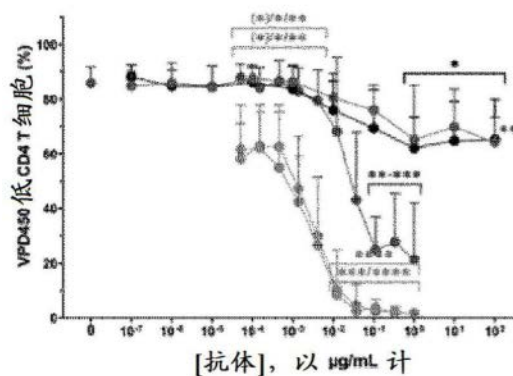


图 18C

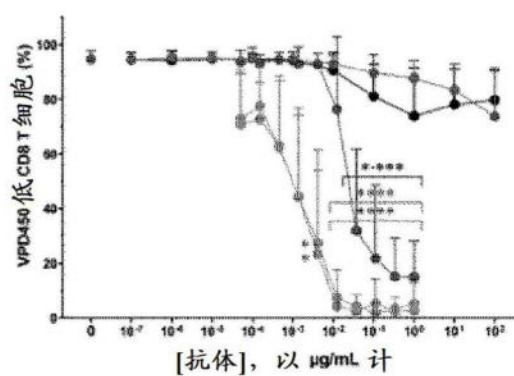
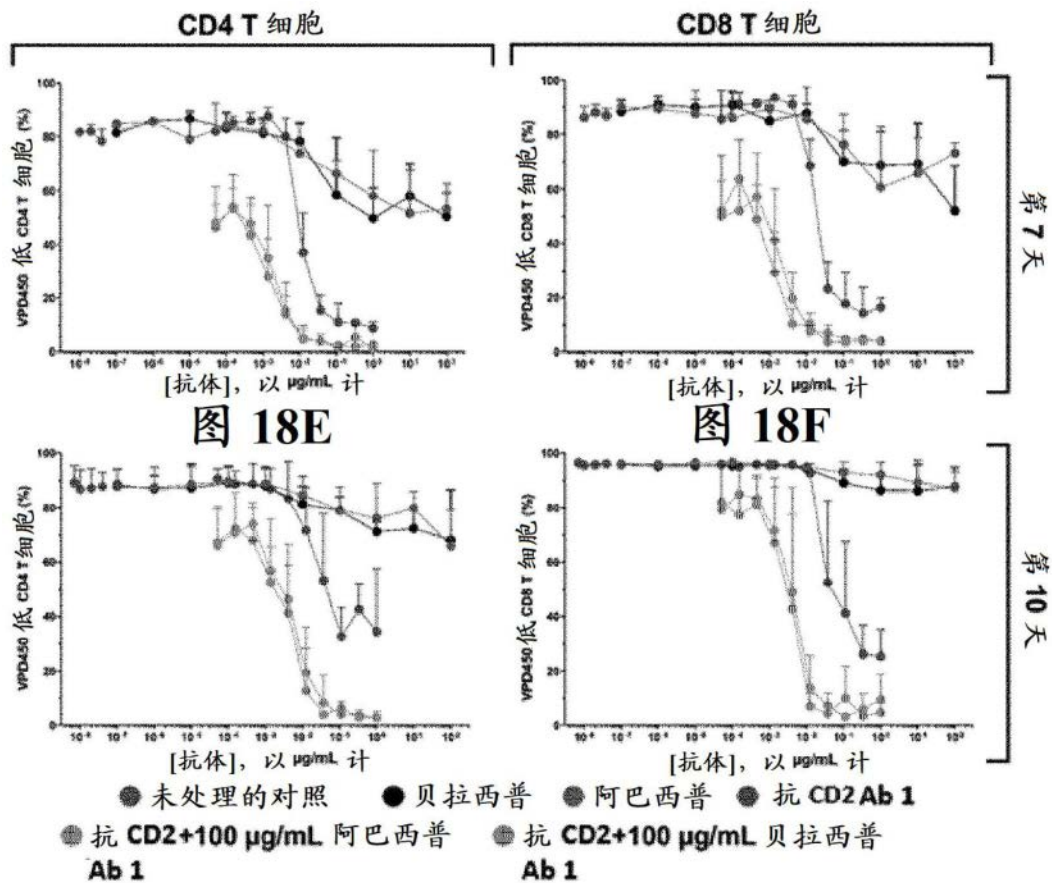


图 18D

● 未处理的对照 ● 贝拉西普 ● 阿巴西普 ● 抗 CD2 Ab 1
 ● 抗 CD2+100 μg/mL 阿巴西普 ● 抗 CD2+100 μg/mL 贝拉西普
 Ab 1 Ab 1



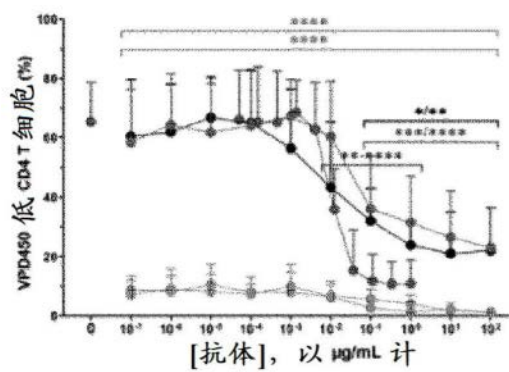


图 19A

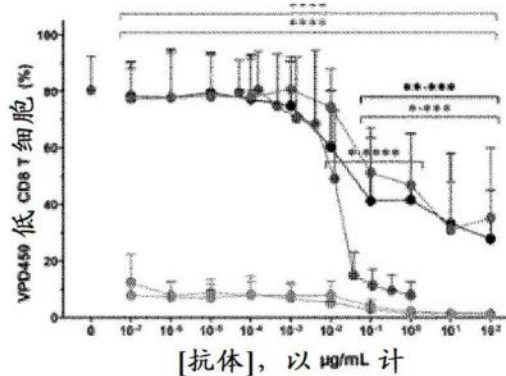


图 19B

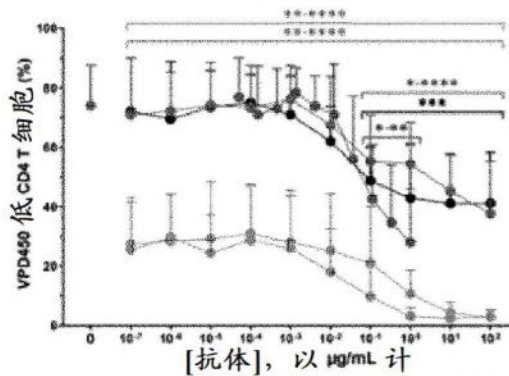


图 19C

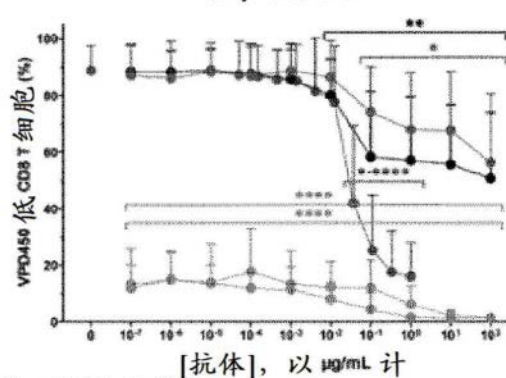


图 19D

● 未处理的对照 ● 贝拉西普 ● 阿巴西普 ● 抗CD2 Ab 1
 ● 阿巴西普+1 μg/mL 抗CD2 Ab 1 ● 贝拉西普+1 μg/mL 抗CD2 Ab 1

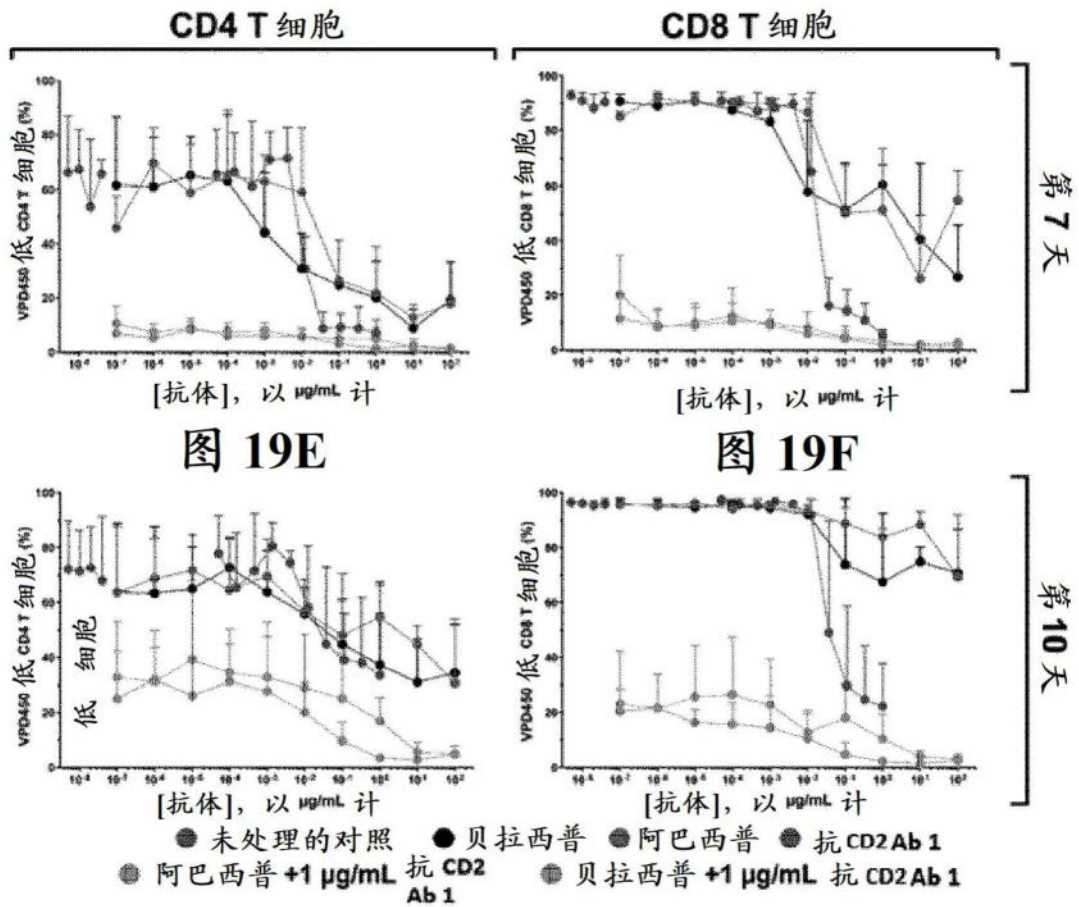


图 19G

图 19H

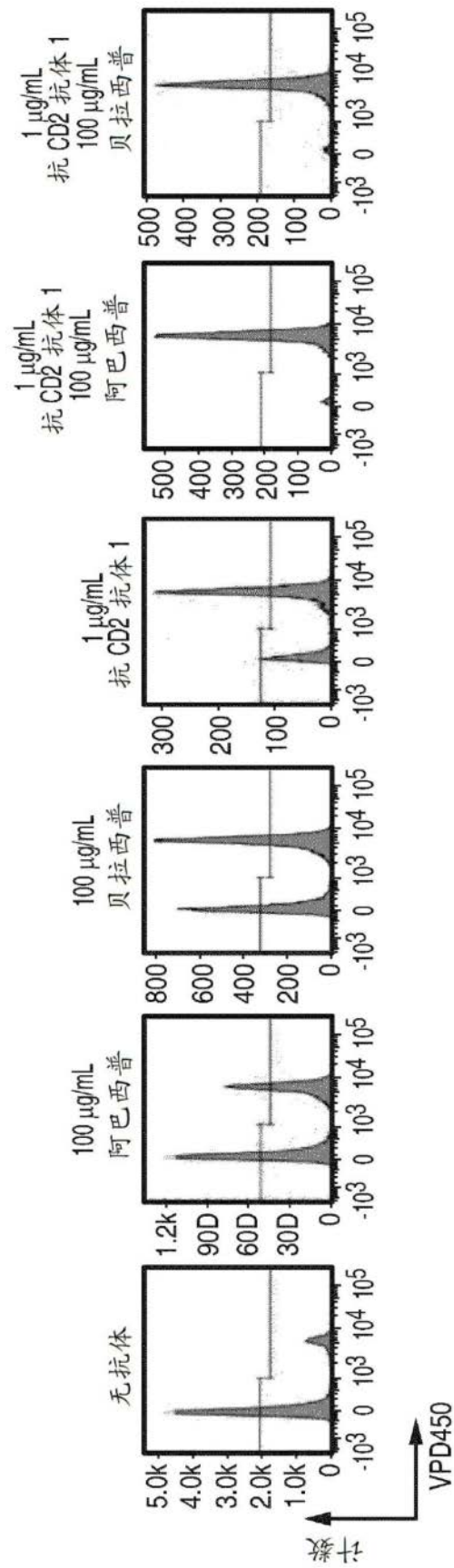


图20

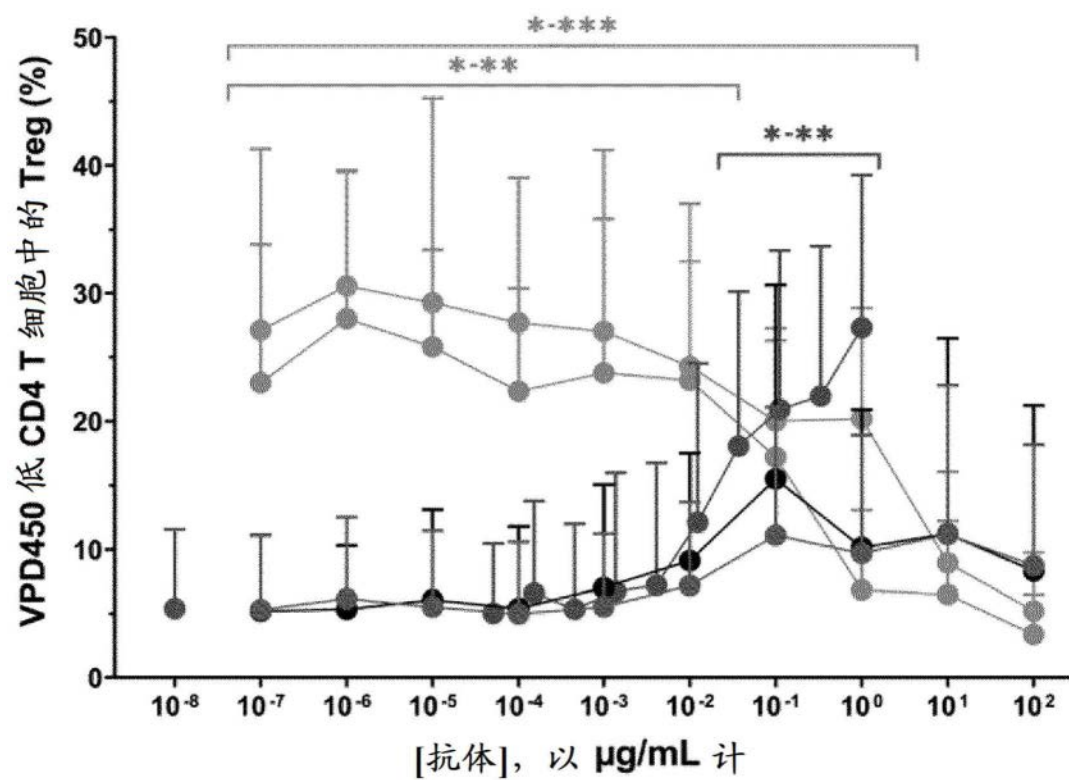


图21

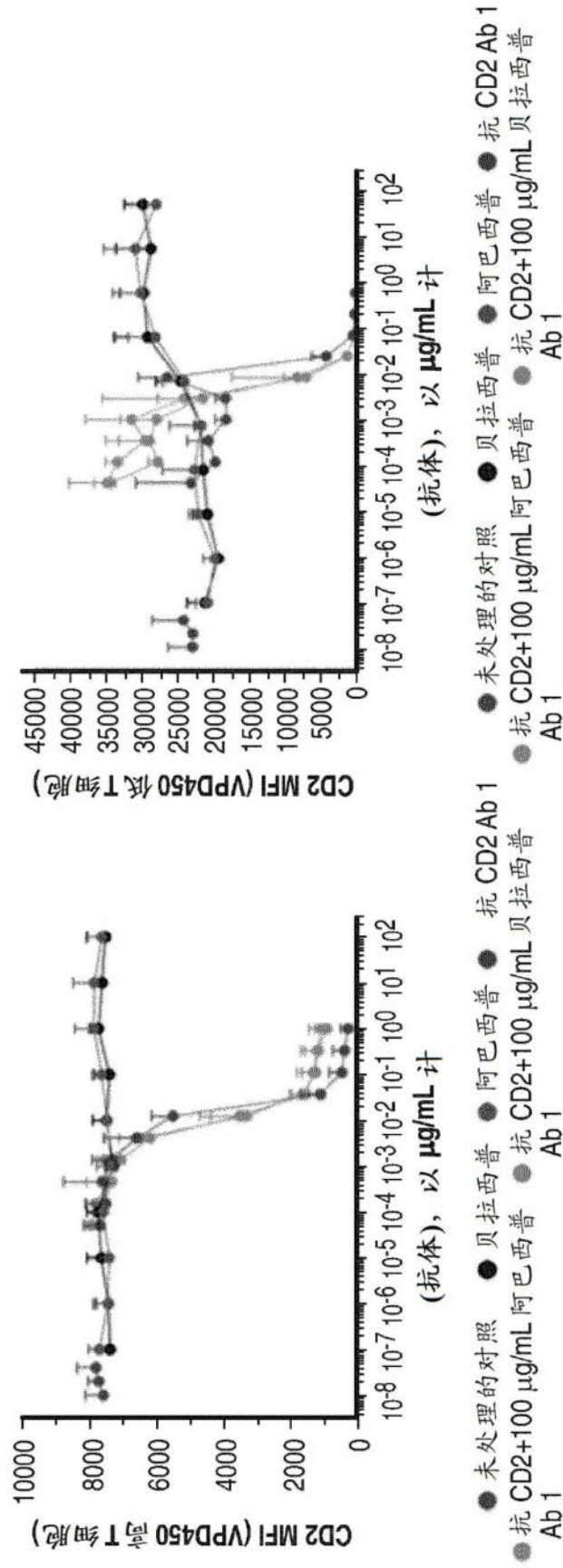


图 22A

图 22B

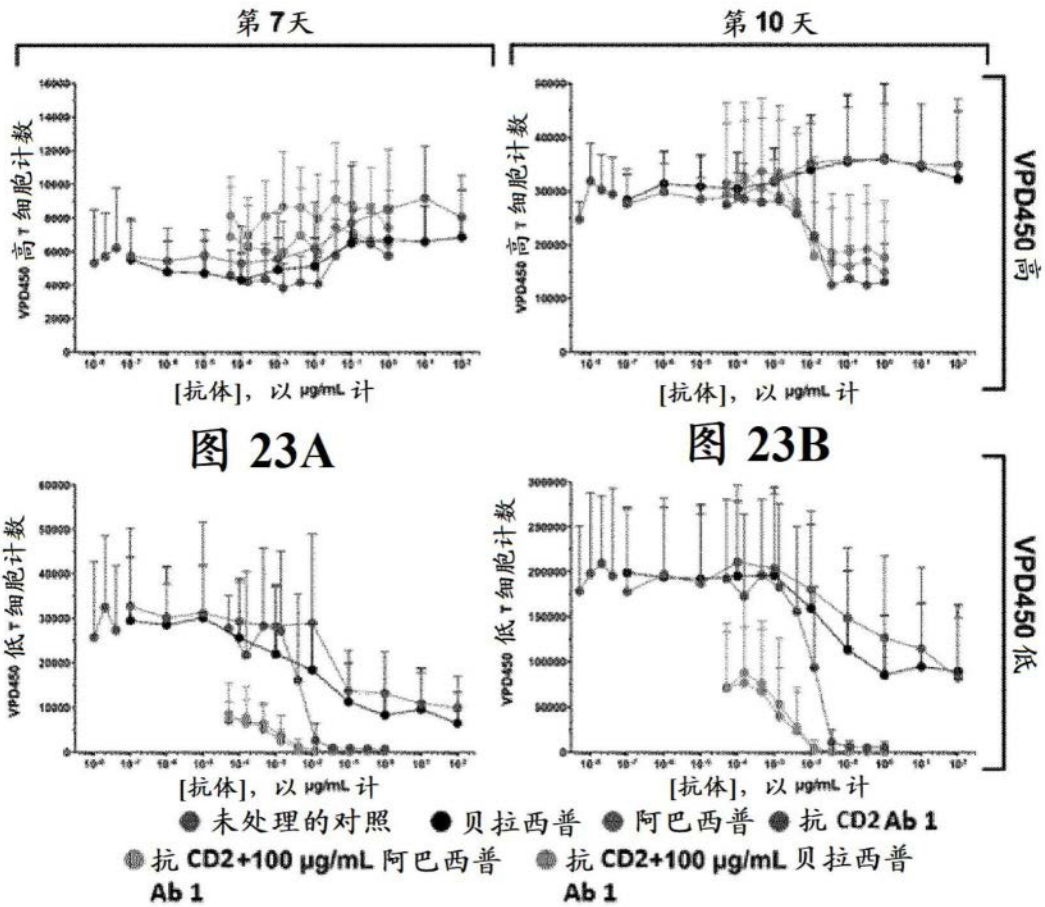


图 23C

图 23D

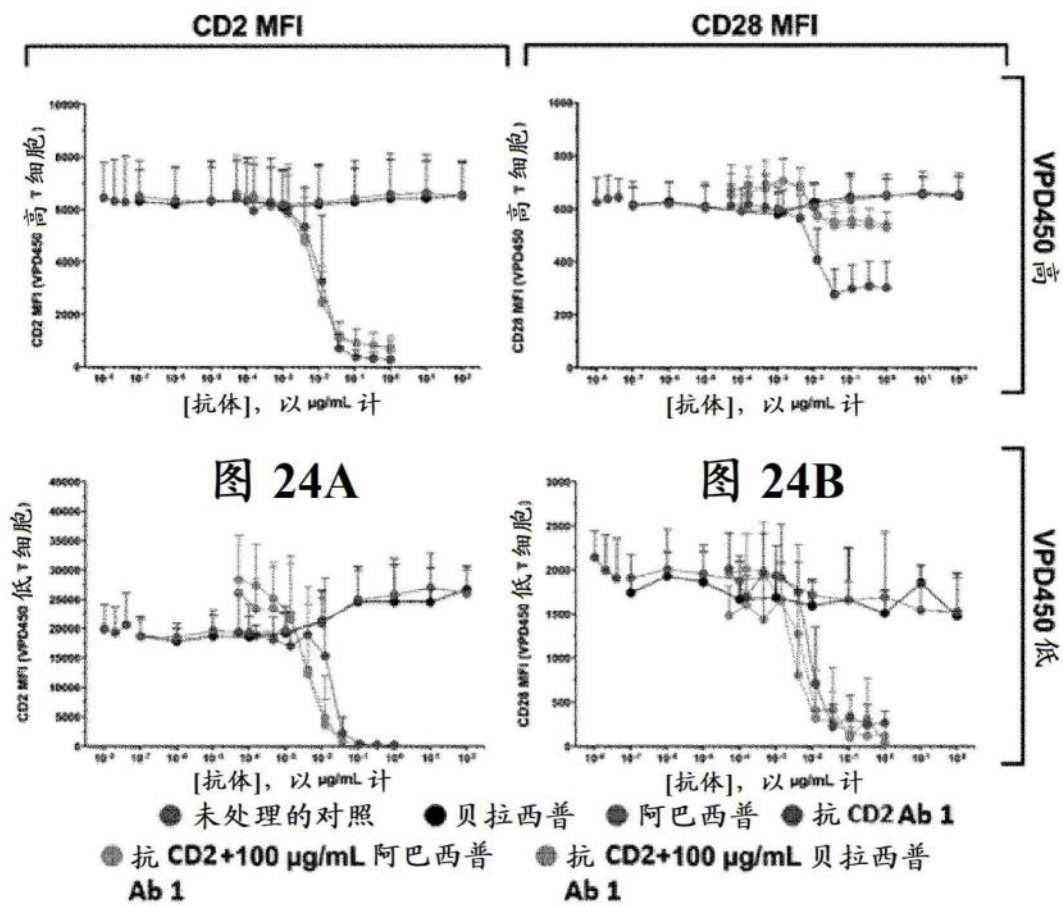
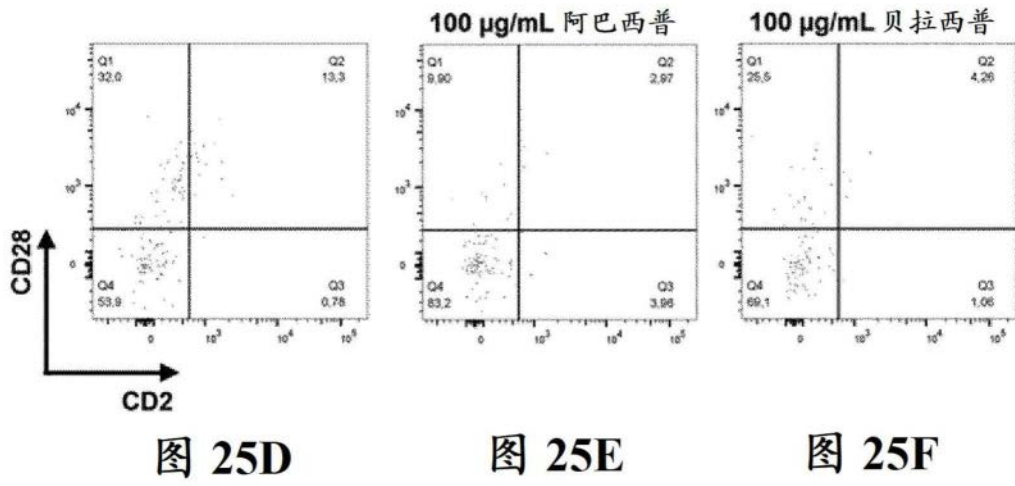
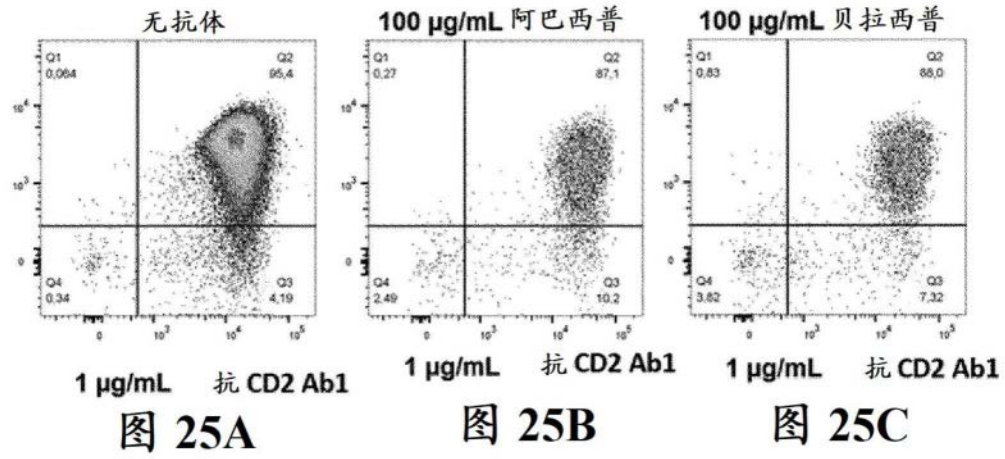
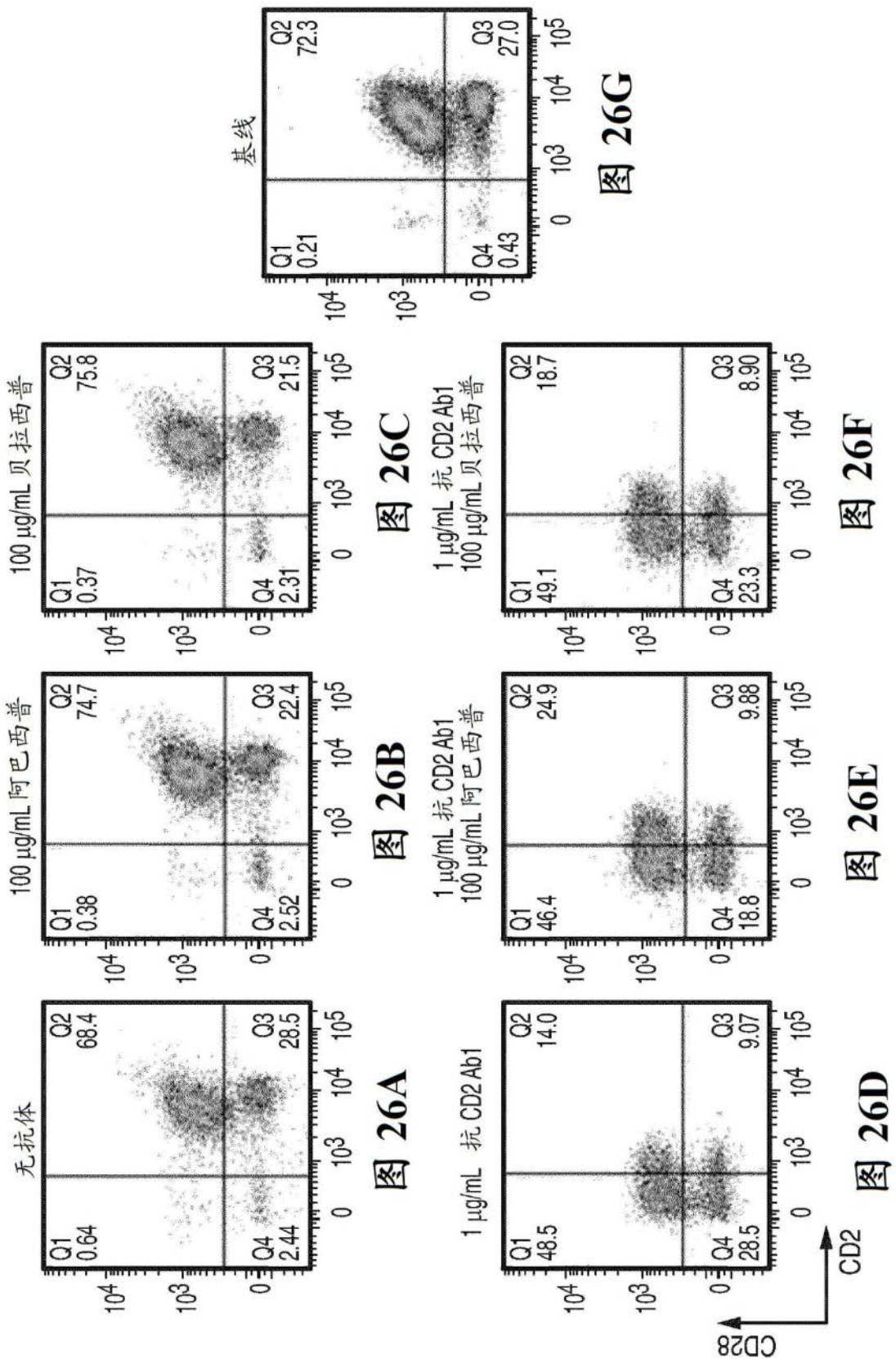


图 24C

图 24D





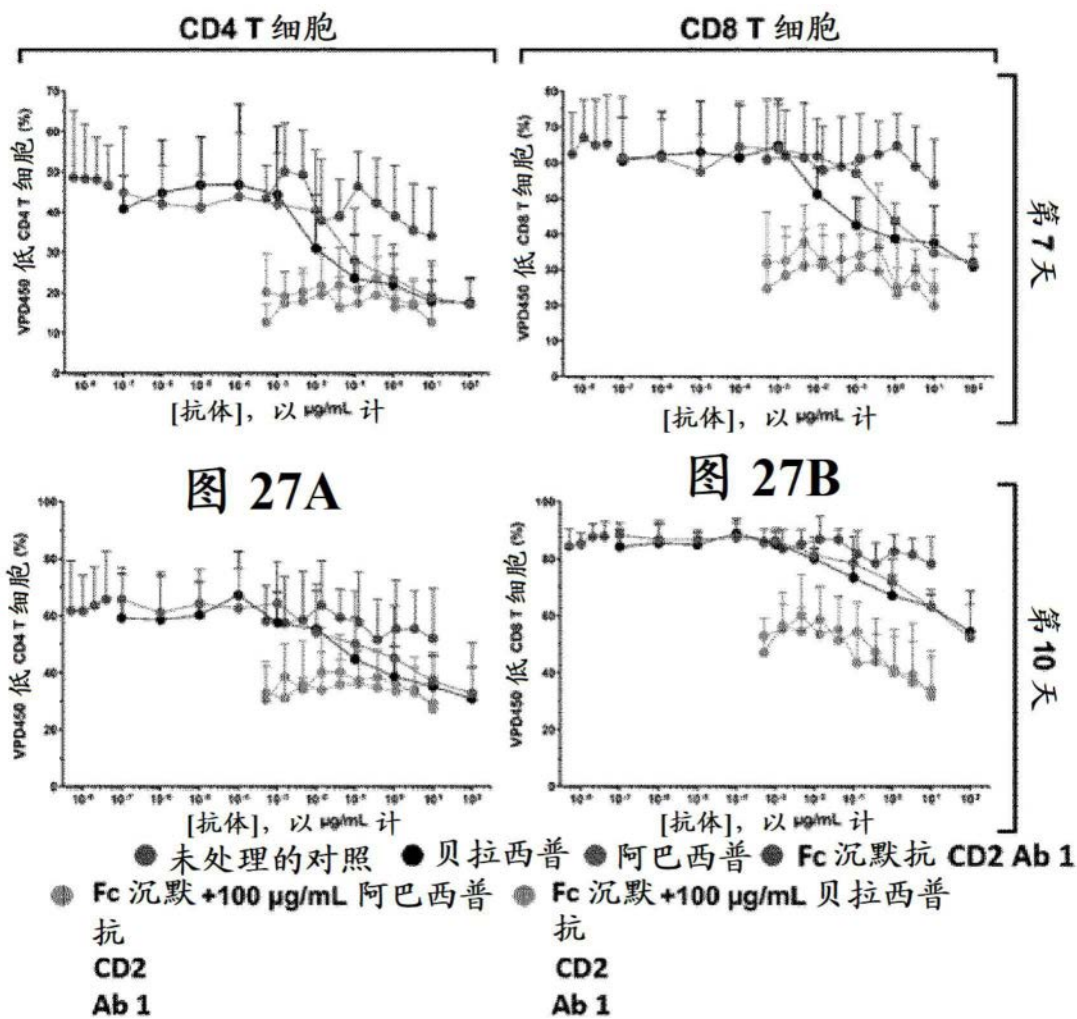


图 27C

图 27D

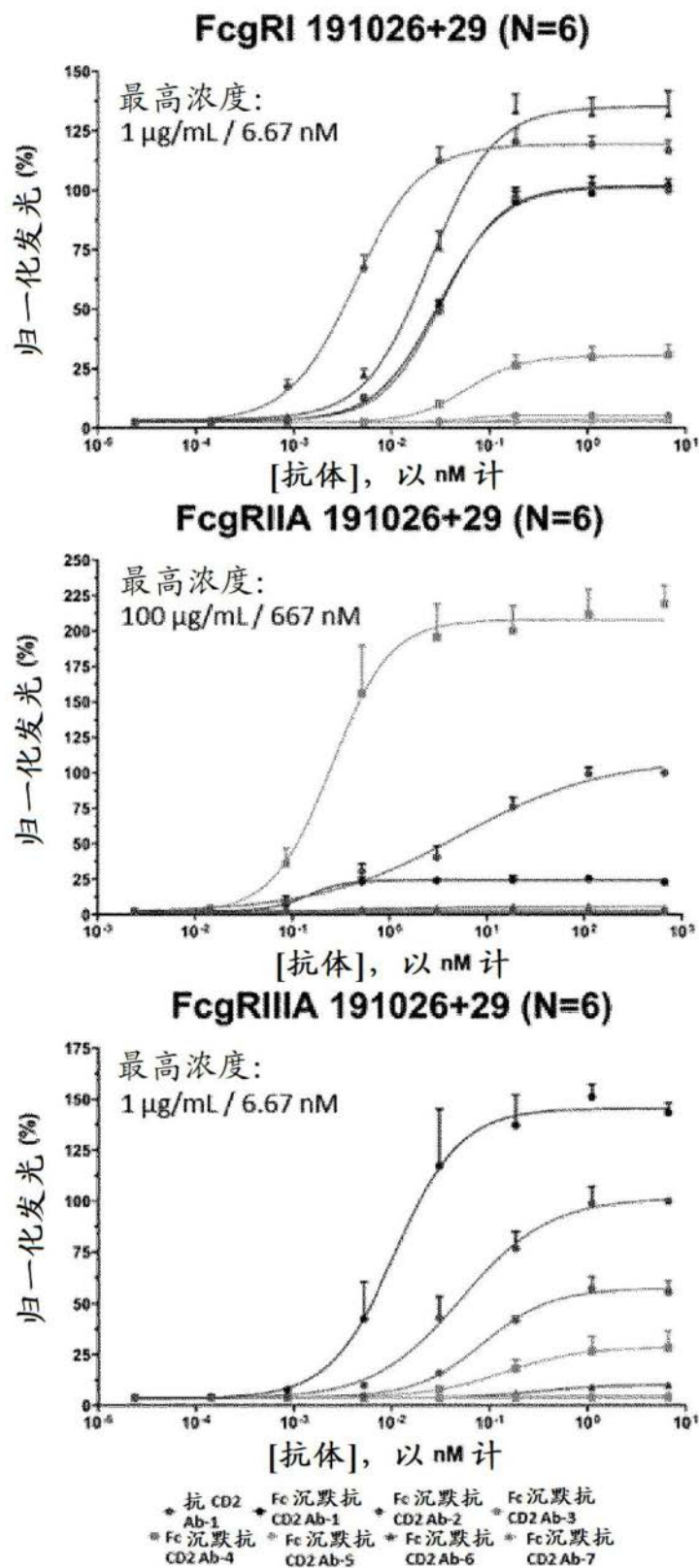


图28

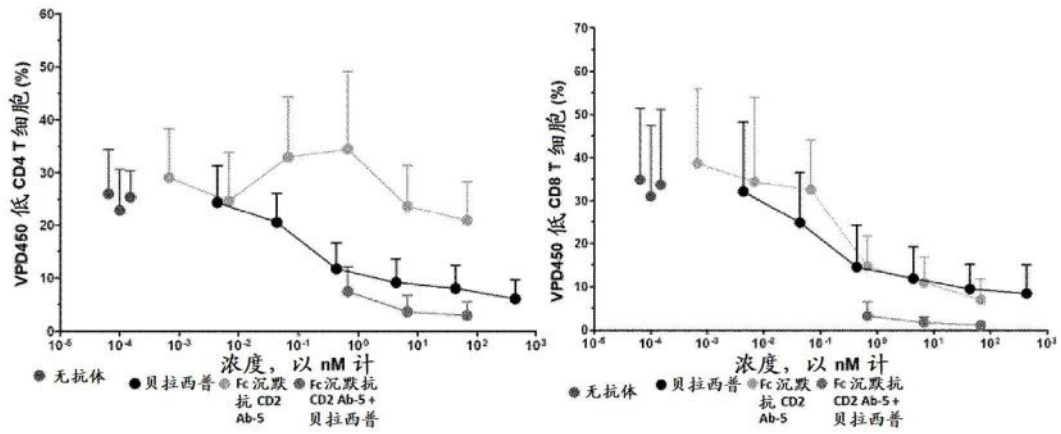


图29A

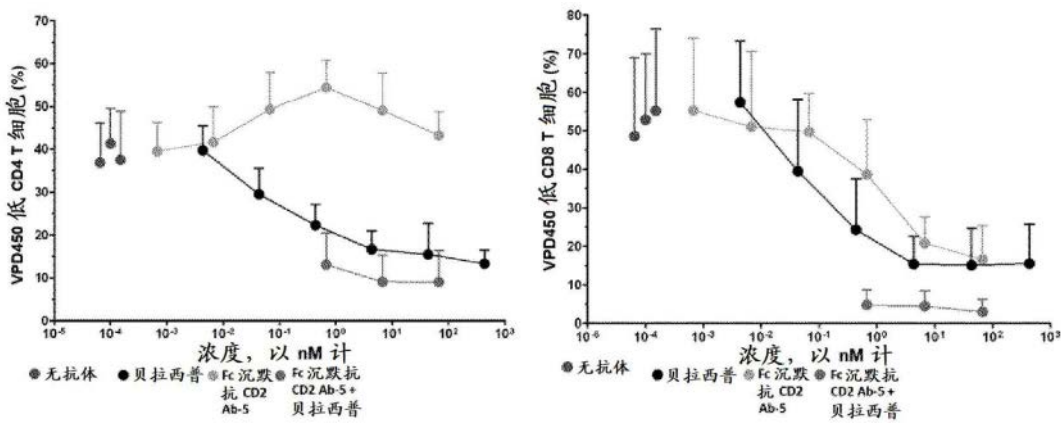


图29B

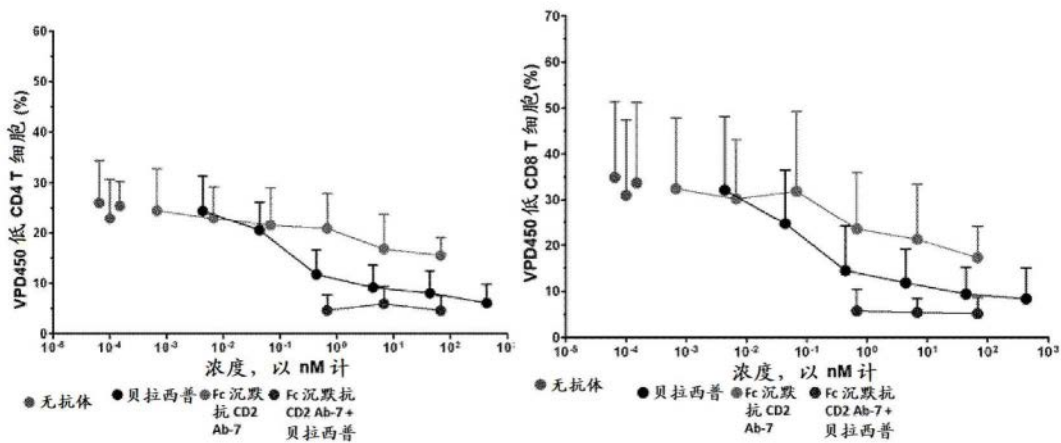


图30A

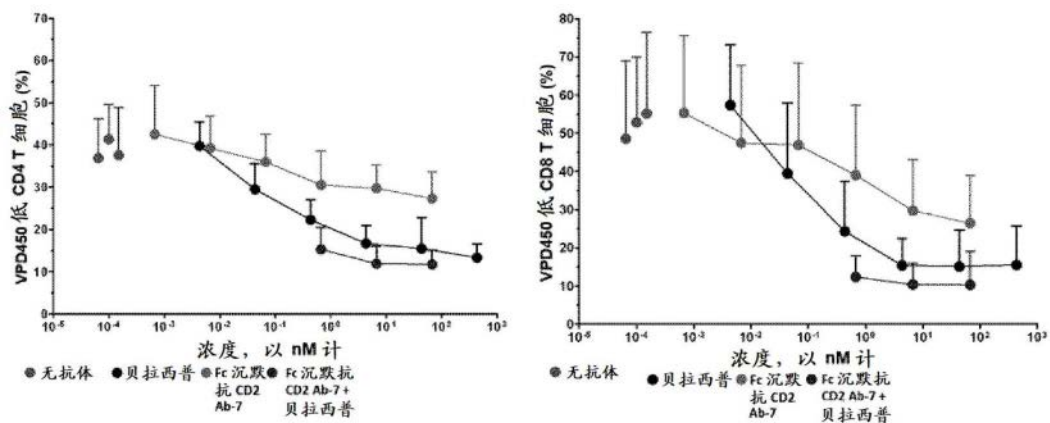


图30B

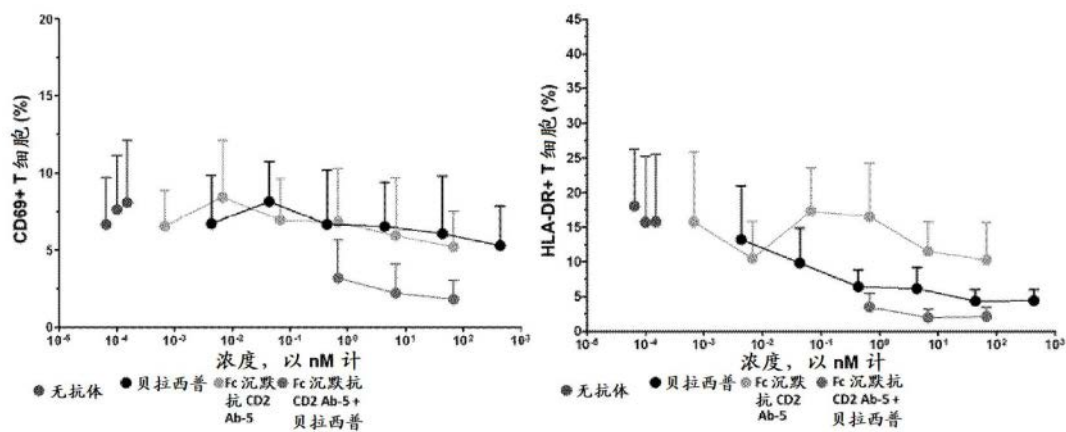


图31A

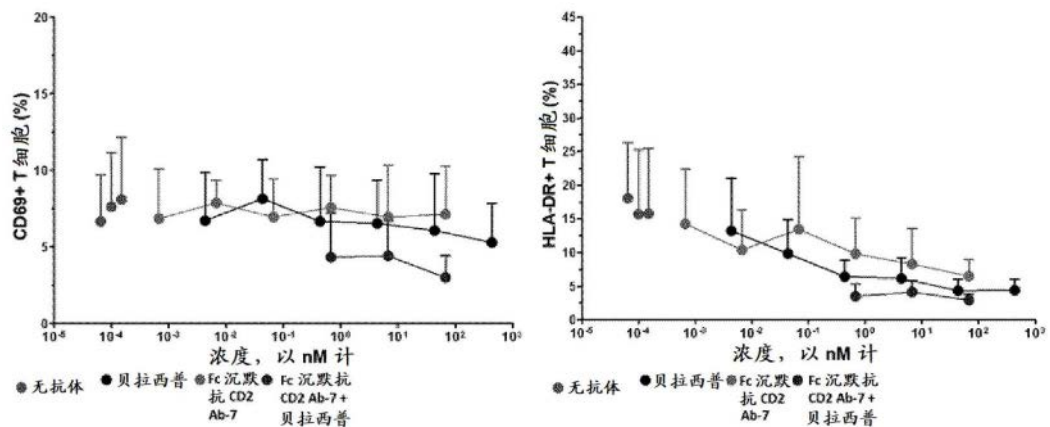


图31B

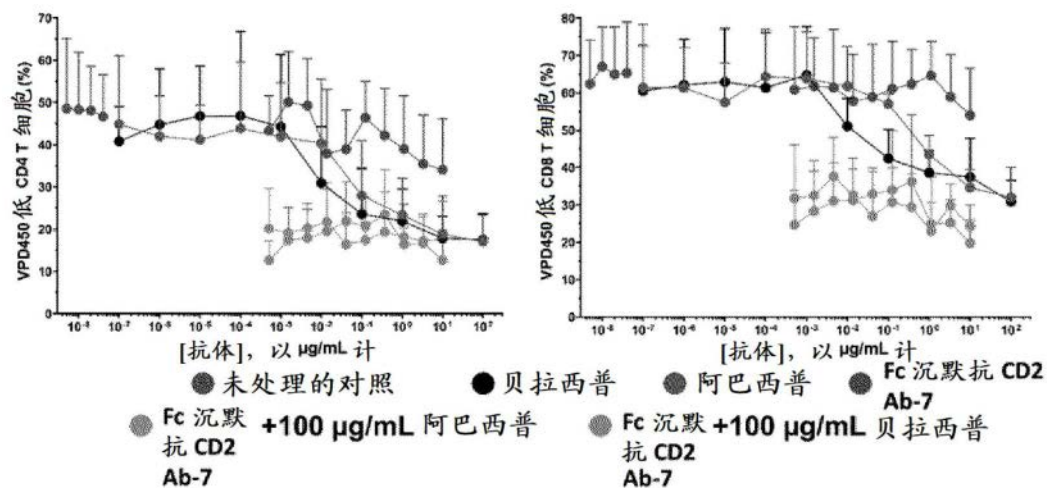


图32A

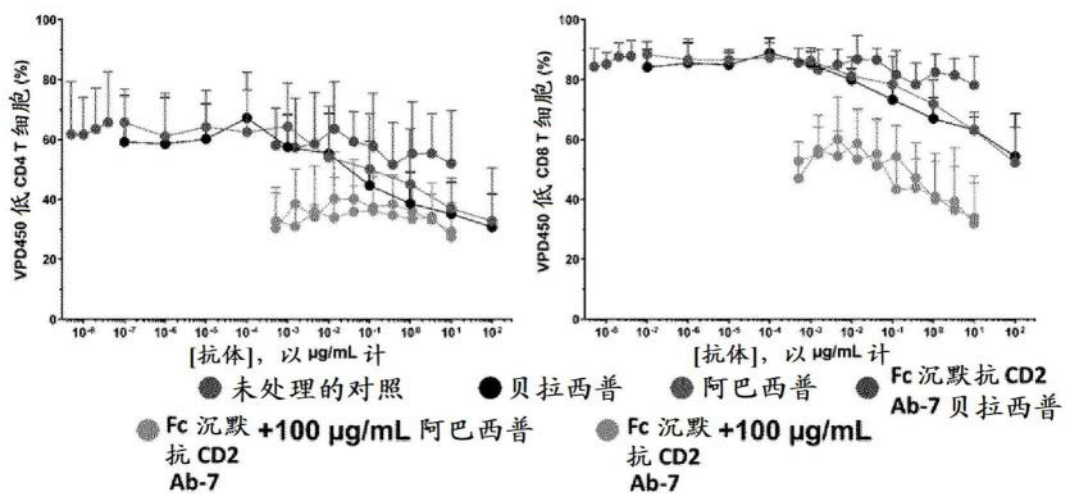


图32B