(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116096749 A
(43)申请公布日 2023.05.09

(21)申请号 202180047298.X

(22)申请日 2021.06.25

(30)优先权数据
20205426.8 2020.11.03 EP
62/705,434 2020.06.26 US
62/705,608 2020.07.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.12.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/067579 2021.06.25

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/260209 EN 2021.12.30

(71)申请人 拜耳公司
地址 德国勒沃库森

(72)发明人 S·贝恩特 K·菲拉斯基 P·埃林格 B·斯特尔特-路德维格 S·霍夫 H·罗伊德 E·韦伯 M·特劳特魏因 C·沃茨迈尔 N·帕夫洛夫斯基 U·格利赞 P·布赫曼 C·伯特灵 O·冯亚森 W·M·纳德勒 S-Y·曾 P·帕兹 P·L·吴 P·琼斯 M·戈尔贾纳茨

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 王北南

(51)Int.Cl.
C07K 16/24(2006.01)

权利要求书5页 说明书307页
序列表（电子公布） 附图84页

(54)发明名称

CCR8抗体及其用途

(57)摘要

本发明涉及用于产生特异性结合趋化因子受体(例如CC或CXC趋化因子)的抗体的工具和方法。本发明提供了分离的硫酸化多肽及其缀合物,其可例如用作抗原或用于脱靶淘选,以促进抗人、抗食蟹猴和/或抗小鼠趋化因子受体抗体的产生,例如用于产生具有完全人CDR和/或其他用于治疗用途的有利性质的抗体。本发明还涉及可通过应用上述工具和方法获得的抗体及其缀合物。提供了特异性结合人、食蟹猴和/或鼠CCR8的抗体,其具有用于治疗用途的有利性质,例如交叉反应性抗体、完全人抗体、低内化(包括非内化)抗体和在Treg细胞中有效诱导ADCC和/或ADCP的抗体。还提供了本发明抗体或缀合物的医学用途和/或治疗方法,其包括单独或组合地向患者或受试者施用这些抗体。最终提供了生物标志物、分层方法和诊断方法来预测或评估抗CCR8抗体单一疗法或组合疗法的响应性。本发明还提供了用于生产上述抗体的工具和方法、药物组合物、抗体的诊断用途以及带有使用说明书的试剂盒。

CN 116096749 A

1.一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是非内化的或特征在于以低于同种型对照的内化的1.5、2、3、4、5、6、7或10倍内化进入具有内源靶标表达的细胞。

2.一种分离的抗体或其抗原结合片段,其特异性结合CCR8,其中所述抗体或片段的特征在于HCDR3区包含10至34%的酪氨酸和2至20%的组氨酸。

3.一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含源自人的CDR。

4.一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段对来自至少两个物种的CCR8具有交叉反应性,优选地选自人、食蟹猴和小鼠,最优选地其中所述抗体或抗原结合片段对人和食蟹猴CCR8具有交叉反应性。

5.一种分离的抗体或其抗原结合片段,其特异性结合CCR8,其中所述抗体或抗原结合片段,

a.不阻断CCL1诱导的β-arrestin信号传导和/或

b.不诱导ERK1/2磷酸化和/或

c.不诱导AKT磷酸化。

6.一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是非岩藻糖基化的,和

a.通过人效应细胞例如人NK细胞,在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),和

b.通过人效应细胞例如人巨噬细胞,在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP),

c.其中最大ADCC和ADCP诱导的表达人CCR8的靶细胞的体外耗竭为至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。

7.根据权利要求2至6中任一项所述的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是非内化的或特征在于以低于同种型对照的内化的1.5、2、3、4、5、6、7或10倍内化到具有内源靶标表达的细胞中。

8.根据权利要求1或3至7中任一项所述的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段的特征在于HCDR3区包含10%至34%的酪氨酸和/或2%至34%的组氨酸。

9.根据权利要求1至2或4至8中任一项所述的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体包含源自人的CDR。

10.根据权利要求1至3或5至9中任一项所述的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段对来自至少两个物种的CCR8具有交叉反应性,优选地选自人、食蟹猴和小鼠,最优选地其中所述抗体或抗原结合片段对人和食蟹猴CCR8具有交叉反应性。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以第一解离常数KD结合来自第一物种的CCR8并且以第二解离常数KD结合来自第二物种的CCR8,其中所述第一和第二解离常数处于相同数量级。

12.根据权利要求1至4或6至11中任一项所述的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段,

a.不阻断CCL1诱导的β-arrestin信号传导和/或

b.不诱导ERK1/2磷酸化和/或

c.不诱导AKT磷酸化。

13.根据权利要求1至5或7至12中任一项所述的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段

a.通过人效应细胞例如人NK细胞,在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),和

b.通过人效应细胞例如人巨噬细胞,在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP),和任选地

c.其中最大ADCC和ADCP诱导的表达人CCR8的靶细胞的体外耗竭为至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段特异性结合CCR8的硫酸化的富含酪氨酸的结构域。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段

(i)以EC50<15nM、<10nM、<5nM、<1nM或<0.6nM

特异性结合

a.人CCR8和/或根据SEQ ID NO:46的分离的多肽,其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,和/或

b.食蟹猴CCR8和/或根据SEQ ID NO:47的分离的多肽,其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,和/或

c.鼠CCR8和/或根据SEQ ID NO:48的分离的多肽,其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化,和/或

(ii)以EC50<50nM、<25nM、<15nM或<10nM结合激活的人调节性T细胞。

16.根据权利要求1至15中任一项的分离的抗体或其抗原结合片段,

a.其中抗体或抗原结合片段以低于530nM、500nM、450nM、400nM、300nM或200nM的解离常数(KD)结合人Fcγ受体IIIA变体V176(CD16a),和/或

b.其中所述抗体或抗原结合片段以低于30μM、20μM、10μM、5μM或1μM的解离常数(KD)结合人FcγRIIA(CD32a)。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是无岩藻糖基化的。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段

a.通过人效应细胞例如人NK细胞,在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),和/或

b.通过人效应细胞例如人巨噬细胞,在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP),

优选地,其中

c.ADCC诱导的激活人调节性T细胞的最大耗竭至少为25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%,和/或

d.ADCP诱导的激活人调节性T细胞的最大耗竭至少为5％、10％、15％、20％、25％、30％、40％或50％，和/或

e.最大ADCC和ADCP诱导的激活的人调节性T细胞的体外耗竭至少为30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、70％、80％、90％、95％或99％。

19.根据权利要求1至18中任一项所述的分离的抗体或抗原结合片段，其中

a.抗体或抗原结合片段对ADCC诱导的激活的人调节性T细胞耗竭的EC50低于100pM、50pM、25pM、12.5pM、10pM或5pM和/或

b.抗体或抗原结合片段对ADCP诱导的激活的人调节性T细胞耗竭的EC50低于500pM、250pM、200pM、150pM、100pM、75pM、50pM或25pM。

20.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或抗原结合片段，其中所述抗体或抗原结合片段的有效剂量

a.在体外或受试者中将激活或瘤内调节性T细胞的数量减少到低于50％、40％、30％、25％、20％、10％、5％或1％，和/或

b.在体外或受试者中将瘤内CD8+T细胞与瘤内Treg的比率增加至至少5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或更高，和/或

c.在体外或受试者体内将瘤内CD4+T细胞中的调节性T细胞百分比降低至<30％、<20％、<10％或<5％。

21.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或抗原结合片段，其中所述抗体或抗原结合片段的有效剂量诱导肿瘤中三级淋巴结构的形成。

22.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是IgG抗体，优选地人IgG1或鼠IgG2a，和/或其中所述抗原结合片段是scFv、Fab、Fab或F(ab')2片段。

23.一种缀合物，其包含根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或抗原结合片段，优选地其中所述缀合物包含

a.放射性元素，

b.细胞毒性剂，例如auristatin、美登木素生物碱、驱动蛋白-纺锤体蛋白抑制剂、烟酰胺磷酸核糖基转移酶抑制剂或吡咯并苯二氮䓬衍生物，

c.另外的抗体或抗原结合片段，或

d.嵌合抗原受体。

24.一种药物组合物，其包含根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或抗原结合片段或根据权利要求23所述的缀合物。

25.根据权利要求24所述的药物组合物，其包含一种或多种另外的治疗活性化合物，优选地选自

a.靶向检查点蛋白的抗体或化合物，例如PD1、PD-L1或CTLA-4，优选地其中靶向检查点蛋白的抗体或化合物是纳武利尤单抗(Nivolumab)、派姆单抗(Pembrolizumab)、阿特珠单抗(Atezolizumab)、阿维鲁单抗(Avelumab)、德瓦鲁单抗(Durvalumab)、塞米普利单抗(Cemiplimab)、达利单抗(Dostarlimab)或伊匹单抗(Ipilimumab)，

b.靶向另外的趋化因子受体的抗体，例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1或CXCR1，

c.靶向HER2和/或EGFR的抗体或小分子，

d.头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌和食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌和/或前列腺癌中的任何一种的标准治疗，

e.化疗剂，优选地紫杉烷、紫杉醇、多柔比星、顺铂、卡铂、奥沙利铂或吉西他滨，

e.B细胞耗竭剂，例如抗CD19抗体或抗CD20抗体，和/或

f.靶向激酶抑制剂，例如索拉非尼、瑞戈非尼或或MEKi-1。

26.根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或抗原结合片段或根据权利要求23所述的缀合物或根据权利要求24或25所述的药物组合物，其用作药物。

27.根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或抗原结合片段或根据权利要求23所述的缀合物或根据权利要求24或25所述的药物组合物，用于治疗以CCR8阳性细胞例如CCR8阳性调节性T细胞为特征的肿瘤或疾病。

28.根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或抗原结合片段或根据权利要求23所述的缀合物或根据权利要求24或25所述的药物组合物，其用于同时、分开或顺序与以下组合治疗以CCR8阳性细胞例如CCR8阳性调节性T细胞为特征的肿瘤或疾病的用途

(i)一种或多种另外的治疗活性化合物，优选地选自

a.靶向检查点蛋白的抗体或小分子，例如PD 1、PD-LI或CTLA-4，优选地其中靶向检查点蛋白的抗体或小分子是纳武利尤单抗(Nivolumab)、派姆单抗(Pembrolizumab)、阿特珠单抗(Atezolizumab)、阿维鲁单抗(Avelumab)、德瓦鲁单抗(Durvalumab)、塞米普利单抗(Cemiplimab)、达利单抗(Dostarlimab)或伊匹单抗(Ipilimumab)，

b.靶向另外的趋化因子受体的抗体，例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1或CXCR1，

c.靶向由肿瘤细胞特异性表达的蛋白的抗体，

d.靶向HER2和/或EGFR的抗体或小分子，

e.头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌、食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌和/或前列腺癌中任何一种的标准治疗，

f.化疗剂，优选地紫杉烷、紫杉醇、多柔比星、顺铂、卡铂、奥沙利铂或吉西他滨，和/或

g.靶向激酶抑制剂，例如索拉非尼、瑞戈非尼或MEKi-1，和/或

(ii)放射疗法，和/或

(iii)耗竭瘤内B细胞。

29.根据权利要求27或28所述的抗体、片段、缀合物或药物组合物，其中所述肿瘤选自T细胞急性淋巴细胞白血病、乳腺癌、三阴性乳腺癌、三阳性乳腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、睾丸癌、胃癌、头颈部鳞状细胞癌、胸腺瘤、食管腺癌、结直肠癌、胰腺癌、卵巢癌或宫颈癌、急性髓系白血病、肾癌、膀胱癌、皮肤癌、黑色素瘤、甲状腺癌、间皮瘤、肉瘤和前列腺癌、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤或涉及CCR8表达细胞的任何其他癌症，优选地其中肿瘤选自头颈癌、乳腺癌，胃癌，肺癌，鳞状细胞癌、食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌、前列腺癌、B细胞淋巴瘤和T细胞淋巴瘤。

30.根据权利要求26至29所述的抗体、片段、缀合物或药物组合物，其中所述用途包括确定

a.肿瘤浸润淋巴细胞的存在或数量，

b.巨噬细胞和/或NK细胞的存在或数量，

c.CCR8阳性或FOXP3阳性调节性T细胞的存在或数量，

d.肿瘤突变负荷，

e.癌症分期，

f.干扰素刺激基因或蛋白的存在、水平或激活，

g.CCR8表达，

h.补体因子蛋白、丝氨酸蛋白酶抑制剂和/或MHC成分的存在或数量，

i.细胞因子的存在或数量，例如炎性或抑制性细胞因子，

j.免疫基因表达的激活，和/或

k.免疫检查点(蛋白)表达，例如PD-(L)1或CTLA4表达，

l.肿瘤浸润性CD19+B细胞的存在或数量，

m.肿瘤浸润性CD8+T细胞的存在或数量；

以预测或监测治疗成功率。

31.一种多核苷酸，其编码根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

32.一种载体，其包含根据权利要求31所述的多核苷酸。

33.一种分离的细胞，其用于产生根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

34.一种产生根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或抗原结合片段或根据权利要求23所述的缀合物的方法，其包括培养根据权利要求33的细胞和任选地纯化抗体或抗原结合片段。

35.根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或抗原结合片段或根据权利要求23所述的缀合物，其用作体内或体外诊断剂。

36.一种试剂盒，其包含根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或抗原结合片段或根据权利要求23所述的缀合物或根据权利要求24或25所述的药物组合物以及使用说明书。

CCR8抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及用于产生特异性结合趋化因子受体如CC或CXC趋化因子受体的抗体的工具和方法。提供了分离的硫酸化多肽及其缀合物，其可用作例如抗原或用于脱靶淘选以促进抗人、抗食蟹猴和/或抗小鼠趋化因子受体抗体的产生，例如用于产生具有完全人CDR和/或其他有利特性以用于治疗用途的抗体。

[0002] 本发明还涉及可通过应用上述工具和方法获得的抗体及其缀合物。提供了特异性结合人、食蟹猴和/或鼠CCR8并具有有利特性用于治疗用途的抗体，例如交叉反应抗体、全人抗体、低内化(包括非内化)抗体、和在Treg细胞中有效诱导ADCC和/或ADCP的抗体。

[0003] 还提供了本发明抗体或缀合物的医学用途和/或治疗方法，包括将这些抗体单独或组合施用给患者或受试者。最终提供了生物标志物、分层方法和诊断方法来预测或评估对抗CCR8抗体单一疗法或组合疗法的响应。

[0004] 本发明还提供了用于产生前述抗体的工具和方法、药物组合物、抗体的诊断用途以及带有使用说明书的试剂盒。

[0005] 技术问题

[0006] 产生CC和CXC趋化因子受体的抗体

[0007] CXC和CC趋化因子受体是特定的七次跨膜G蛋白偶联受体，可介导趋化梯度中的细胞迁移。由于其固有的结构、生物物理和生物学特性，趋化因子受体是抗体生成的具有挑战性的目标类别。难以获得针对趋化因子受体的最佳抗体的原因有多种，这将以示例性方式进行讨论，重点放在人CCR8上。

[0008] 趋化因子受体的特点是嵌入细胞膜中的七个结构域，因此在其天然确认中不易纯化。纯化的天然趋化因子受体将从膜环境中移除，因此可能在构象上受到损害。这些损坏的结构通常不适合抗体生成，因为抗体需要识别呈现在细胞表面的完整抗原。虽然一些趋化因子受体，如CXCR4和CCR5，具有一些固有的稳定性，允许在温和的洗涤剂中纯化，但这不适用于大多数趋化因子受体(Hutchings,Catherine J.,et al."Opportunities for therapeutic antibodies directed at G-protein-coupled receptors."Nature reviews Drug discovery 16.11(2017):787.)。事实强调了这一点，直到今天，蛋白质数据库PDB(rcsb.org)中还没有可用于CCR8的X射线晶体结构。

[0009] 因此，对于趋化因子受体来说，为了获得天然构象中所需数量的蛋白质以及正确的方向和折叠以用作免疫原而进行增溶是很困难的(参见cf.Klarenbeek,Alex,et al."Targeting chemokines and chemokine receptors with antibodies."Drug Discovery Today:Technologies 9.4(2012):e237-e244.)。

[0010] 人CCR8整体结构的示意图如图2b所示。在355个氨基酸中，残基1-35(N端)、94-107(ECL1)、172-202(ECL2)和264-280(ECL3)被预测为细胞外结构域(uniprot.org)。假设这些细胞外结构域采用三级结构，由二硫键稳定。因此，平均不到30％的趋化因子受体暴露在细胞表面。因此，趋化因子受体尤其是CCR8不易接近抗体结合，如WO200744756中所述。

[0011] 此外，针对对应于趋化因子受体细胞外结构域的肽产生的抗体通常无法识别细胞

上的完整受体,这可能是由于二级结构的差异。因此,该领域的研究人员在开发抗体方面的成功率很低(Tschammer,Nuska,ed.Chemokines:chemokines and their receptors in drug discovery.Vol.14.Springer,2015,Chapter by J.E.Pease&R.Horuk,section 6,page 12,2nd para)。

[0012] 获得抗鼠CCR8抗体的抗体生成似乎稍微不那么困难,发明人可以复制传统方法,例如Kremer和Márquez描述的方法(D'Ambrosio,Daniele,and Francesco Sinigaglia.Cell Migration in Inflammation and Immunity.Springer,2004.,Chapter by Kremer and Márquez p.243-260)。鼠和人CCR8的序列同一性约为70%,对于细胞外结构域而言甚至更低,如实施例2中更详细的描述。然而,Kremer和Márquez讨论,抗小鼠趋化因子受体单克隆抗体的产生是一项艰巨的挑战,尽管自首次报道其氨基酸序列以来已经过去了一段时间,但针对小鼠趋化因子受体的抗体却相对稀少。

[0013] CCR8的治疗性抗体及其医药用途

[0014] 尽管它们的产生存在困难,但靶向CC趋化因子受体的抗体已被建议作为各种疾病的有前途的治疗工具,例如基于对涉及免疫细胞的疾病或以趋化因子受体异常表达为特征的各种癌症适应症的机制洞察。

[0015] 2004年,Curiel等可以显示对于104名卵巢癌患者的CD4+CD25+FOXP3+调节性T细胞(Treg细胞或Tregs),人肿瘤Treg细胞抑制肿瘤特异性T细胞免疫并促进体内人类肿瘤的生长(Curiel,Tyler J.,et al."Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival."Nature medicine 10.9(2004):942-949.)。

[0016] 肿瘤细胞和微环境巨噬细胞产生趋化因子,例如CCL22,它介导Treg细胞向肿瘤的运输。肿瘤微环境中高水平的Tregs不仅与许多癌症(如卵巢癌、乳腺癌、肾癌和胰腺癌)的预后不良有关,而且会抑制针对这些癌症的免疫应答,例如通过抑制免疫系统效应细胞的作用。因此,Treg细胞的这种特异性募集代表了肿瘤可以促进免疫特权的一种机制。因此,有人建议阻断Treg细胞迁移或功能以战胜人类癌症。

[0017] 意识到Curiel的发现后,围绕Plitas/Rudensky和De Simone/Abrignani/Pagani的两个独立团队发现肿瘤浸润性Treg细胞的特征在于CCR8的选择性表达。事实上,对于肿瘤浸润性Treg,Treg细胞耗竭的选择性很重要,因为Treg细胞的全身耗竭可能导致严重的自身免疫(Nishikawa,Hiroyoshi,and Shimon Sakaguchi."Regulatory T cells in tumor immunity."International journal of cancer127.4(2010):759-767)。由于Treg细胞显示出类似于效应淋巴细胞的分子模式,因此寻找特定的Treg标记变得复杂,参见实施例11.2。外周Treg和肿瘤特异性效应细胞在肿瘤内Treg耗竭期间不应遭受友军攻击,因为外周Treg对于避免自身免疫很重要,而肿瘤特异性效应细胞有助于控制肿瘤。

[0018] 基于这些发现,多个团队建议使用CCR8抗体选择性耗竭肿瘤浸润性调节性T细胞。虽然一些人提供的数据证实了使用抗人CCR4或抗鼠CCR8抗体在肿瘤模型中减小肿瘤,从而证实了Treg耗竭的机制概念,但仍需要治疗性抗人CCR8抗体,例如在治疗应用中具有卓越的性能。

现有技术

[0019] 1.1抗原、方法和抗体

[0020] 抗体生成中抗原的选择对于所得抗体的特性至关重要，并且可能造成严重问题，如本文别处所讨论的趋化因子受体如CCR8。在某些情况下，已经使用全细胞作为抗原获得了抗体，这些细胞被工程化用于过度表达趋化因子受体。至少对于某些趋化因子受体而言，这些方法似乎受到产生的结合物数量少的影响。此外，用这些抗原获得的抗体通常具有对趋化因子受体的脱靶结合和低特异性的特征。如果将整个细胞用作抗原，则免疫显性表位可以掩盖其他抗原性较低的表位，而抗原性较低的表位可能会产生所需的选择性和特异性抗体。

[0021] 对于CCR8，WO2007044756(ICOS)中描述了一种成功的“全细胞”方法。简而言之，抗CCR8单克隆抗体是通过用在细胞表面表达高水平CCR8的用CCR8转染的辐射细胞免疫Balb/c小鼠而开发的。来自这些小鼠的脾细胞通过标准方法融合以产生产生抗体的杂交瘤。阳性库由FACS鉴定，并通过有限稀释进行克隆。其中两种抗体433H和459M在免疫组织化学中显示出对人CCR8的特异性反应性。抗体433H仍然可用，可从BD购买。

[0022] Biolegend分发克隆L263G8，这是一种纯化的小鼠IgG2a抗人CCR8抗体，是使用人CCR8转染子作为免疫原产生的。

[0023] Kremer和Márquez描述了针对鼠CCR8的单克隆抗体的产生(D'Ambrosio,Daniele,and Francesco Sinigaglia.Cell Migration in Inflammation and Immunity.Springer,2004.,Chapter by Kremer and Márquez p.243-260)。简而言之，Kremer和Márquez描述了使用源自鼠CCR8细胞外结构域的肽作为免疫原，但并未暗示酪氨酸的硫酸化。事实上，发明人发现Kremer和Márquez描述的方法可以成功应用于识别鼠CCR8的抗体，但用于识别人CCR8的抗体的成功率很低。

[0024] Schaerli等通过用人CCR8肽缀合物(对应于CCR8 N端区域的1-34位与KLH或BSA偶联)免疫兔子产生了抗人CCR8抗体，但同样，不建议酪氨酸硫酸化(Schaerli,Patrick,et al."A skin-selective homing mechanism for human immune surveillance T cells."The Journal of experimental medicine 199.9(2004):1265-1275.)。

[0025] Haque等描述了一种与来自CCR8细胞外N端部分的含有26个氨基酸的肽结合的鼠单克隆抗体(Haque,Nasreen S.,et al."The chemokine receptor CCR8 mediates human endothelial cell chemotaxis induced by I-309 and Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded vMIP-I and by lipoprotein(a)-stimulated endothelial cell conditioned medium."Blood,The Journal of the American Society of Hematology 97.1(2001):39-45.)。

[0026] 这些用于抗体产生的方法均未使用包含趋化因子受体或跨膜蛋白的富含酪氨酸结构域(TRD)的分离的硫酸化多肽作为抗原。使用包含趋化因子受体或跨膜蛋白的TRD的分离的硫酸化多肽作为抗原影响所获得抗体组的结构和功能特征，如本文别处所讨论的。

[0027] 因此，认为根据本发明的抗体在结构和功能上确实不同于上述现有技术的抗体，例如至少在它们对硫酸化CCR8的亲和力、它们对未硫酸化CCR8的亲和力、它们调节受体信号传导的方式和程度、它们的内化行为、交叉反应性、清除率和药代动力学行为以及最终的Treg耗竭和/或功效方面用于治疗应用。

[0028] 此外,使用本文公开的抗原能够产生完全人抗体。相反,所讨论的针对CCR8的现有技术抗体是非人来源的并且与本发明的一些抗体不同,至少因为它们不包含人类CDR。

[0029] 1.2医学用途和作用方式

[0030] 癌症免疫疗法涉及使用受试者的免疫系统来治疗或预防癌症。免疫疗法通常利用这样一个事实,即癌细胞表面通常具有可以被免疫系统检测到的细微不同的分子,即癌症抗原。因此,免疫疗法涉及激发免疫系统通过这些癌抗原攻击肿瘤细胞。然而,一些癌症,如实体瘤或血液癌症,可以逃避免疫监视。例如,调节性T细胞(Treg细胞或Tregs)的肿瘤浸润,更具体地说,效应T细胞(Teff)与Tregs的低比率已被认为是肿瘤躲避免疫系统的关键因素(Smyth,Mark J.,Shin Foong Ngiow,and Michele WL Teng."Targeting regulatory T cells in tumor immunotherapy."Immunology and cell biology 92.6(2014):473-474.)。

[0031] 众所周知,表达Foxp3的调节性T细胞是预防自身免疫不可或缺的,可有效抑制肿瘤免疫。Treg细胞大量浸润到肿瘤组织中,这通常与癌症患者的不良预后有关。去除Treg细胞可增强抗肿瘤免疫应答,但也可能引发自身免疫。定制靶向Treg的癌症免疫疗法的一个关键问题在于特异性耗竭浸润到肿瘤组织中的Treg细胞而不影响肿瘤反应性效应T细胞,同时抑制自身免疫。

[0032] 早在2010年,各种团队就已经研究对Treg耗竭例如通过用抗CD25抗体耗竭可以提高小鼠的抗肿瘤免疫力。已经表明,在接种肿瘤细胞之前耗竭Treg会导致它们的有效排斥,而在肿瘤接种同时或之后发生的Treg耗竭不会导致肿瘤消退。也有人认为,这是由于施用的耗竭抗体也去除了表达CD25的效应T细胞,而CD25-Foxp3+Tregs持续存在(Klages,Katjana,et al."Selective depletion of Foxp3+regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma."Cancer research 70.20(2010):7788-7799.)。

[0033] 2015年,无岩藻糖基化人源化抗人CCR4单克隆抗体mogamulizumab(KW-0761)在一项针对CCR4阳性癌症患者的临床研究中进行了评估(Kurose,Koji,et al."Phase Ia study of FoxP3+CD4 Treg depletion by infusion of a humanized anti-CCR4 antibody,KW-0761,in cancer patients."Clinical Cancer Research 21.19(2015):4327-4336.)。CCR4在调节性T细胞上表达。事实上,mogamulizumab有效地耗尽了Treg细胞,并观察到对癌症抗原的特异性免疫反应的增强或诱导。然而,mogamulizumab靶向外周和肿瘤内Treg以及其他效应细胞群,从而导致免疫学副作用,例如皮疹或史蒂文斯约翰逊综合征。

[0034] 因此,虽然Treg耗竭在癌症治疗中的巨大潜力是显而易见的,但缺少选择性靶向Treg和避免明显自身免疫的概念。2015年和2016年,Plitas/Rudensky和De Simone/Abrignani/Pagani这两个团队的工作改变了这一点。

[0035] Plitas等证明CCR8由人乳腺癌浸润性Treg细胞选择性表达,并立即得出结论,靶向CCR8代表了一种有前途的免疫治疗方法,用于治疗患有乳腺癌和其他肿瘤的患者(Plitas,G.,et al."Abstract P4-04-11:Preferential expression of the chemokine receptor 8(CCR8)on regulatory T cells(Treg)infiltrating human breast cancers represents a novel immunotherapeutic target."(2016):P4-04.;Plitas,George,et

al."Regulatory T cells exhibit distinct features in human breast cancer." Immunity 45.5(2016):1122-1134.;US10087259)。

[0036] 在Plitas等的初步工作发表后不久,De Simone等发表了关于肿瘤浸润性调节性T细胞的转录图景的分析,发现肿瘤浸润性Treg细胞具有高度免疫抑制作用,并在其细胞表面表达CCR8作为特定的特征分子(De Simone,Marco,et al."Transcriptional landscape of human tissue lymphocytes unveils uniqueness of tumor-infiltrating T regulatory cells."Immunity 45.5(2016):1135-1147.,WO2017198631)。作者描述了CCR8与不良预后相关,并得出结论认为CCR8可能是一个有趣的治疗靶点,可以抑制Treg细胞运输到肿瘤部位,同时不会干扰不表达CCR8的其他效应T细胞的募集。

[0037] WO2018112032和WO2018112033描述了降低肿瘤中肿瘤浸润性调节性T细胞(TITR)的数量或活性的方法,包括施用在表达基因产物例如CCR8的细胞中诱导细胞毒性的试剂。

[0038] WO2018112033和EP3431105描述了一种可以调节至少一种标志物(在肿瘤浸润调节性T细胞中选择性失调)的表达和/或功能的分子用于预防和/或治疗该肿瘤。

[0039] WO2018181425涉及具有ADCC活性的针对CCR8的抗体,用于治疗癌症的方法,其中针对CCR8的抗体是CCR8中和抗体。WO2018181425没有公开具体的抗体序列,而是指由BioLegend在目录号150302下分发的大鼠抗小鼠CCR8克隆SA214G2。该抗体用作工具抗体,以概括先前描述的小鼠Treg耗竭的抗肿瘤发生作用。

[0040] 根据本发明,提供了一种促进抗CCR8抗体的产生并产生具有用于治疗用途的优异特性的抗体的方法。将根据本发明的抗体与现有技术的抗体进行比较,发现在结构、功能和治疗功效上存在差异,如本文别处所讨论的。

[0041] 问题的解决方案

[0042] 1.1 CC和CXC趋化因子受体的抗体的生成

[0043] 由于现有技术方法产生CC趋化因子受体的抗体的成功率低,并且所得抗体通常表现不佳(参见例如实施例3),发明人开发了一种新方法来产生趋化因子受体的抗体,并且特别地,产生抗CCR8抗体。

[0044] 使用经过特殊修饰的分离多肽作为抗原来选择人抗人CCR8抗体解决了提供针对CC和CXC趋化因子受体的抗体生成的改进方法的问题,例如可以首次获得完整的人抗CCR8抗体,参见实施例6。更详细地,通过在特定位置引入硫酸盐修饰来修饰包含人CCR8的富含酪氨酸结构域(任选地包括LID结构域)的多肽以形成抗原,参见实施例4,表4.1。噬菌体展示方法任选地与这种特别修饰的抗原一起使用以选择完全人抗人CCR8抗体。或者,硫酸化抗原可用于各种其他方法,例如在常规免疫方法中。

[0045] 获得的抗体对硫酸化抗原和在生理条件下表达的生物靶标显示出极好的结合特征,参见实施例6、10.1.1,但对未修饰抗原的亲和力相对较低或没有亲和力,参见实施例10.1.2、实施例10.1.3,表明硫酸化残基确实对抗原抗体结合至关重要。本发明的抗体还显示出对经工程化以表达人、食蟹猴或鼠CCR8的细胞系以及激活的人Tregs的极好且特异的结合,参见实施例10.1.1。

[0046] 在抗体的六个CDR环中,H3环显示出最大的结构多样性并且位于结合位点的中心。它还通过亲和力成熟获得最多的突变,平均与抗原的接触次数最多。因此,它在抗原结合中起着至关重要的作用。分析根据本发明的方法获得的抗体的具体结构,令人惊奇地发现,

HCDR3的组成在结构上不同于通常的人HCDR3结构域,参见实施例9。特别地,具有治疗上最有益特性和与CCR8特异性结合的抗体的HCDR3结构域的特征在于平均频率为～21％的酪氨酸残基和平均含量为～10％的组氨酸,强调了这些残基对特异性硫酸化抗原识别的有益影响(参见表9.2)。

[0047] 不受理论的束缚,发明人认为这些结构特征转化为某些功能特征,这使得获得的抗体更适合于治疗应用。例如,与测试的现有技术抗体相比,根据本发明的几种抗体阻断G蛋白依赖性信号传导,参见实施例10.4.3,但不影响G蛋白非依赖性途径,参见实施例10.4、10.4.1、10.4.2,并且基本上不内化到具有靶趋化因子受体内源性表达的细胞中,参见实施例10.5。此外,根据本发明的特别优选的抗体对靶受体和靶细胞具有特异性,参见实施例10.2、11,并且在癌症治疗方法中特别适用/显示出优异的特性,参见实施例12ff。此外,使用这些合成多肽作为抗原或用于脱靶淘选促进或能够产生交叉反应抗体,例如特异性结合人CCR8和/或食蟹猴CCR8的抗体,参见实施例10.1.1。

[0048] 1.2提供特异性结合趋化因子受体的治疗性抗体

[0049] 1.2.1获得具有人CDR的趋化因子受体抗体

[0050] 虽然用鼠CDR对抗体进行人源化可能会提高抗体的免疫原性,但残留的免疫原性存在于CDR区域(Harding,Fiona A.,et al."The immunogenicity of humanized and fully human antibodies:residual immunogenicity resides in the CDR regions." MAbs.Vol.2.No.3.Taylor&Francis,2010)。因此,与包含来自其他物种的CDR的抗体相比,包含人CDR的抗体被认为更适合作为人类治疗剂。

[0051] 例如,可以通过噬菌体展示技术或使用能够产生完全人抗体的转基因动物来生产具有人CDR的抗体。然而,获得完全人抗体并不总是微不足道的。虽然理论上HCDR3区域的多样性几乎是无限的,但在实践中,抗体库多样性的产生似乎受到多种机制的仔细调节,这些机制产生的体内库在其多样性和抗原结合位点的范围内受到限制。人类噬菌体展示文库也是如此,它们通常旨在反映体内库。因此,在某些情况下,啮齿动物CDR可以满足“复杂”抗原的结构要求,而人CDR无法轻易识别相同的结构。根据观察到酪氨酸在人HCDR3中的表现比在鼠HCDR3中平均低约50％,可以假设在需要酪氨酸和组氨酸的独特结合能力才能实现靶标结合的情况下,寻找人抗人抗体显然更具挑战性。事实上,本发明人不知道完全人抗人CCR8现有技术抗体。根据本发明,提供了包含人源CDR的CCR8抗体,以及完全人抗体,参见实施例6、7、8。

[0052] 1.2.2获得交叉反应性趋化因子受体抗体

[0053] 交叉反应性抗趋化因子受体抗体如交叉反应性抗CCR8抗体有利于治疗性抗体的开发,因为它们可用于非人类动物模型,以在药理学数据和安全性方面表征治疗剂,然后将抗体施用于人类。然而,交叉反应抗体,例如在两个物种中具有相似结合行为的很难产生并且不容易亲和力成熟,例如因为CCR8等趋化因子受体的细胞外部分在物种之间具有低同源性(参见实施例2)。根据本发明,针对CCR8的交叉反应抗体尤其可以通过使用包含在物种之间具有更高保守性的基序的小硫酸化酪氨酸来产生,使得结合来自两个或更多物种的趋化因子受体如CCR8的交叉反应抗体例如可以通过简单方便的方式获得具有相同数量级的亲和力,参见实施例6、7、10.1.1。

[0054] 1.2.3获得用于治疗的趋化因子受体抗体

[0055] 为了诱导杀死表达靶标趋化因子受体或CCR8的细胞,可以设想多种作用模式。一种作用模式是将靶向趋化因子受体或CCR8的抗体与药物缀合为抗体药物缀合物(ADC)的形式。其他可能的作用模式是诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。对于ADCC、CDC和ADCP,涉及两步机制:一方面,需要抗体或片段有效结合靶细胞,例如通过CCR8的Treg,另一方面,抗体的FC部分(或可以与抗体或片段缀合的替代结合部分,如本文别处所述)必须结合效应细胞,然后介导靶标细胞的杀伤。对于ADCP,作为效应细胞与巨噬细胞的结合通常通过抗体FC部分与巨噬细胞表达的FcγRIIa(CD32a)的相互作用发生。相反,ADCC是通过抗体或片段与FcγRIIIa的相互作用介导的。在人类中,FcγRIII以两种不同的形式存在:FcγRIIIa(CD16a)和FcγRIIIb(CD16b)。FcγRIIIa作为跨膜受体在肥大细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞上表达,而FcγRIIIb仅在中性粒细胞上表达。这些受体与IgG抗体的Fc部分结合,然后激活由人类效应细胞介导的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0056] 1.2.4获得低内化(包括非内化)趋化因子受体抗体

[0057] 当发明人分析已知的抗人CCR8现有技术抗体时,他们发现这些抗体很容易内化到具有内源靶标表达的细胞中,但不会长时间驻留在细胞表面。抗体的内化行为不仅会影响其清除和药理学行为,还会影响其对治疗用途的特定作用模式的适用性。

[0058] 虽然高内化对于某些抗体药物缀合物的产生是可取的,但对于ADCC诱导的肿瘤细胞或Treg细胞的耗竭是不可取的。更详细地说,需要抗体药物缀合物将药物转运到细胞中,以实现对靶细胞的有效和特异性耗竭。相反,ADCC作用模式需要抗体及其Fc结构域暴露在靶细胞外部,免疫效应细胞可以在此处结合FC结构域以裂解靶细胞。因此,低或甚至没有内化率会增加ADCC/ADCP诱导抗体的作用时间。

[0059] 在对用新方法获得的抗体进行表征后,发明人惊奇地发现,根据本发明的几种抗体在具有内源性CCR8表达水平的细胞中表现出特别低或甚至不存在内化特征,参见实施例10.5,而识别相同靶标的现有技术抗体具有更高的内化率。例如,现有技术的抗体433H和L263G8很容易内化到靶细胞中,并且不会长时间驻留在细胞表面。由于它们的低内化特性,因此根据本发明的一些抗体特别适用于ADCC、ADCP、CDC或混合方法,例如组合的ADCC/ADCP方法。

[0060] 通常,靶标的选择是强烈影响抗体内化进入细胞的重要因素。根据Islam SA等的说法,CCL1配体结合会诱导CCR8的Ca2+通量(flux)和快速受体内化(Islam,Sabina A.,et al."Identification of human CCR8 as a CCL18 receptorCCR8 is a CCL18receptor." The Journal of experimental medicine 210.10(2013):1889-1898.)。发明人惊奇地发现抗体本身能够如此大程度地影响内化特性。然而,当他们表征本发明的抗体调节其靶趋化因子受体的G蛋白非依赖性信号通路的能力时,他们发现所有测试的现有技术抗体不仅阻断G蛋白依赖性信号,而且还调节G蛋白非依赖性信号,参见实施例10.4ff。G蛋白非依赖性信号先前已与内化行为相关联,参见Fox,James M.,et al."Structure/function relationships of CCR8 agonists and antagonists:Amino-terminal extension of CCL1 by a single amino acid generates a partial agonist."Journal of Biological Chemistry 281.48(2006):36652-36661。

[0061] 1.2.5获得调节靶受体信号的趋化因子受体抗体

[0062] 抗体调节趋化因子受体的方式有多种。例如,抗体可以

[0063] a)阻断G蛋白非依赖性信号,

[0064] b)阻断G蛋白依赖性信号,

[0065] c)阻断G蛋白依赖性和G蛋白非依赖性信号传导,

[0066] d)增加G蛋白非依赖性信号,

[0067] e)增加G蛋白依赖性信号,

[0068] f)增加G蛋白依赖性和G蛋白非依赖性信号传导。

[0069] 不受理论的束缚,发明人假设相应趋化因子受体的硫酸化TRD可能与配体诱导的趋化因子受体信号传导相关。有趣的是,大多数本发明的抗体有效地阻断了配体诱导的G蛋白依赖性信号但不影响G蛋白非依赖性信号,参见实施例10.4ff。相反,所有现有技术抗体同样阻断配体诱导的G蛋白依赖性信号传导但激动G蛋白非依赖性信号传导。不受理论的束缚,这些差异可能导致内化行为的差异。

[0070] 避免治疗性抗体诱导G蛋白非依赖性信号传导也可能是有利的,因为非特异性信号传导可能导致无法控制的下游效应,例如细胞增殖增加,参见Hutchings,Catherine J.,et al.(2017);Webb,David R.,et al."Opportunities for functional selectivity in GPCR antibodies."Biochemical pharmacology 85.2(2013):147-152.;Fox,James M.,et al.(2006)。

[0071] 1.2.6获得ADCC/ADCP诱导趋化因子受体抗体

[0072] 根据本发明的抗体的特征在于对ADCC和ADCP的优异诱导,如例如在实施例10.3.3、10.3.4中所示。在一些优选的实施方式中,通过消除N297处的岩藻糖(无岩藻糖基化)来工程化抗体以获得高ADCC率,参见实施例10.3.1。有趣的是,许多本发明的抗CCR8抗体似乎通过使用两种机制(即ADCC和ADCP)的联合作用模式诱导靶细胞耗竭。

[0073] 1.3治疗方法

[0074] 虽然几个研究小组已经建议基于机制见解在治疗方法中使用结合CCR8的抗体,但提供具有最佳治疗特性的抗体的方法一直很缺乏。通过提供根据本发明的抗体产生方法,现在可以容易地获得具有优异治疗特性的趋化因子受体抗体。根据本发明,公开了具有有利特性的各种序列定义的抗体,其可用于治疗方法,例如在基于ADCC的方法中,在基于ADCP的方法中,在基于CDC的方法中,或在混合的基于ADCC/ADCP的方法中,作为缀合物的一部分。实施例12 ff显示用根据本发明的方法产生的替代抗体在Treg耗竭、总体反应率和肿瘤与对照比率方面显示出显著的功效。

[0075] 1.4联合治疗

[0076] 虽然在使用本发明的抗CCR8抗体的单一疗法中获得了显著的反应率,但令人惊讶地发现,通过将抗体与免疫检查点抑制剂、进一步的靶向疗法、甚至非特异性化学疗法或放射疗法相结合,可以进一步提高治疗益处。这些联合治疗在具有挑战性的肿瘤模型中特别有益。特别地,发现特定的联合治疗方案是有效的,其中仅在抗-CCR8抗体引起大量Treg耗竭后施用第二治疗剂或疗法(参见实施例12.6 ff.)。此外,观察到即使是单一的抗CCR8抗体治疗也显示出显著的治疗效果(见实施例12.4.2)。

[0077] 1.5分层方案及诊断方法

[0078] 在评估不同同基因小鼠模型对抗CCR8抗体治疗的反应性时,发明人可以确定可预

测治疗效果和总体响应的几种机制、生物标志物和生物标志物组合。例如，令人惊讶地发现，对免疫检查点抑制剂(如PD-1、PD-L1或CTLA4抗体)的响应程度也可预测对抗CCR8抗体治疗的响应。由于PD-L1表达有时被用作预测免疫检查点抑制剂响应性的替代标志物，发明人评估了PD-L1是否也可用于预测抗CCR8抗体治疗的响应性。这一假设最终可以通过相关数据得到证实，请参见实施例12.7.1。在鉴定最有可能受益于抗CCR8治疗的那些受试者的进一步尝试中，进一步的标志物基因例如免疫细胞和Treg标志物被评估为生物标志物(见实施例12.1.2、12.7.2、12.8)。

附图说明

[0079] 图1：人CC趋化因子受体和CXC趋化因子受体的比对。

[0080] 图2：从Uniprot检索CCR8、食蟹猴CCR8和鼠CCR8序列并用Clustal Omega比对。b.CCR8受体结构示意图，其包含7个跨膜结构域(黑框)、三个细胞外环(ECL)、多个二硫键(SS)和一个细胞内C端部分以及包含“LID”结构域和富含酪氨酸结构域(TRD)的细胞外N端结构域。

[0081] 图3：在CCR8阳性靶细胞中通过FACS染色评估三种现有技术抗体。与同种型对照相比，所显示的现有技术抗体均未显示出FACS染色的变化。hAP-0068和MAB1429-100在用CCR8稳定转染的293T细胞上进行了测试，而MAB8324在表达鼠CCR8的BW5147.3细胞上进行了测试。

[0082] 图4：寻找先导化合物的淘选策略：描述了两种主要的硫酸化肽选择策略。在所有策略中，在每一轮选择之前，都包括对相关或不相关的生物素化蛋白的去除步骤。

[0083] 图5：获得抗鼠CCR8抗体的淘选策略：描述了基于硫酸化/非硫酸化肽混合的主要选择策略。在每一轮选择之前，对相关的生物素化蛋白质进行去除步骤。

[0084] 图6：结合表达CCR8的CHO细胞的本发明抗体的FACS数据。

[0085] 图7：结合表达食蟹猴CCR8的CHO细胞的本发明抗体的FACS数据。

[0086] 图8：与激活的人Tregs(供体1)结合的候选者的FACS数据。右侧：使用BioLegend克隆L263G8确定的CCR8表达的百分比。

[0087] 图9：本发明抗体TPP-21181和TPP-23411与表达CCR8的CHO细胞结合的FACS数据。

[0088] 图10：本发明抗体TPP-21181和TPP-23411与表达食蟹猴CCR8的CHO细胞结合的FACS数据。

[0089] 图11：TPP-21360、L263G8和433H与表达人CCR8的CHO细胞的结合。

[0090] 图12：TPP-21360、L263G8和433H与表达食蟹猴CCR8的CHO细胞的结合。现有技术抗体仅显示出与食蟹猴CCR8的总体结合非常低(低饱和度)。然而，可以确定每种抗体的EC50值。

[0091] 图13：用本发明抗体TPP-23411激活的人Treg染色，门控策略。来自外周血单核细胞(PBMC)的CD4+和CD25+分选细胞用抗CD3和抗CD28珠(Treg扩增试剂盒，Miltenyi)激活。中间格：CD4+CD25+CD127low和Foxp3+的细胞。下格：用TPP_23411或L263G8染色后Treg上的CCR8表达。

[0092] 图14：TPP-21360与具有模拟转染子的CHO细胞的结合。没有观察到非特异性结合。

[0093] 图15：瞬时转染人CCR1的HEK细胞中的脱靶结合。大多数本发明的候选物仅显示出

对CCR1的低脱靶结合。

[0094] 图16:用人CCR4瞬时转染的HEK细胞中的脱靶结合。大多数本发明的候选物仅表现出对CCR4的低脱靶结合。

[0095] 图17:来自健康供体PBMC的不同免疫细胞群(CD4+ T细胞、CD8+ T细胞、以CD19+表达为标志的B细胞、以CD11b+表达为标志的骨髓细胞、用抗CD3和抗CD28珠子激活CD4 T细胞4天,用抗CD3和抗CD28珠子激活CD8+ T细胞4天)。

[0096] 图18:激活后CCR8在人Tregs中上调。激活后,随着MFI增加,CD4+CD25+纯化细胞中CCR8+细胞的百分比显著增加,而PBMC群体中CCR8+细胞的百分比略有增加。来自BioLegend的抗CCR8抗体用于这些实验。N=4个供体。

[0097] 图19:在作为靶细胞的表达人CCR8的HEK细胞中由野生型或无岩藻糖基化的本发明抗体TPP-19546、TPP-21360或TPP-23411诱导的ADCC。同种型对照:TPP-9808。

[0098] 图20:左图:作为靶细胞的激活的人Treg在第3天的CCR8+表达百分比。右图:由野生型或无岩藻糖基化的本发明抗体TPP-21360、TPP-23411在作为靶细胞的激活Treg中诱导的ADCC。同种型对照:TPP-9808。结果在不同的供体中是可重复的(数据未显示)。

[0099] 图21:ADCP测定的方案。

[0100] 图22:本发明抗体的野生型和非岩藻糖基化形式的ADCP测定显示在作为靶细胞的表达CCR8的HEK细胞、作为效应细胞的以体外分化的M2c巨噬细胞中诱导的吞噬作用。本发明抗体TPP-19546、TPP-21360和TPP-23411的野生型和无岩藻糖基化形式诱导ADCP。TPP-9808是同种型对照。Mogamulizumab是一种已上市的抗CCR4抗体。

[0101] 图23:本发明抗体TPP-21360和TPP-23411的野生型和非岩藻糖基化形式的ADCP测定显示在作为靶细胞的来自两个不同供体的激活的人Treg中(上图或下图)和作为效应细胞的M2c巨噬细胞中诱导的吞噬作用。

[0102] 图24:本发明抗体TPP-21360和TPP-23411的野生型和非岩藻糖基化形式的ADCP测定显示在作为靶细胞的激活的人Treg和作为效应细胞的M1巨噬细胞中诱导的吞噬作用。

[0103] 图25:在共表达用ProLink标记的CCR8和EA的CHO细胞上,针对CCL1、TPP-23411、L263G8或433H用DiscoverX测定测量的β-arrestin信号传导的激活。正如预期的那样,CCR8配体CCL1(人)诱导β-arrestin信号传导。针对TPP-23411分析了额外的时间点,以确保在较早的时间点没有发生β-arrestin激活。所分析的抗体均未诱导β-arrestin信号激活。

[0104] 图26:用DiscoverX测定测量TP-23411、L263G8或433H对CCL1诱导的β-arrestin信号传导的阻断的评估。CCL1以其EC80(20ng/ml)使用。现有技术抗体L263G8和433H均在低抗体浓度下阻断由CCL1诱导的β-arrestin信号传导,而本发明抗体TPP-23411在这些浓度下未显示出任何作用。β-arrestin信号传导已被建议在内化中发挥作用。

[0105] 图27:Phospho Erk1/2 ELISA测定。用CCL1、TPP-23411、Biolegend L263G8或BD抗体433H处理表达人CCR8的CHO细胞,并在各自的时间点收集细胞裂解物。

[0106] 图28:Phospho Erk1/2 ELISA测定。用CCL1、TPP-23411、Biolegend L263G8或BD抗体433H处理表达CCR8的激活的人Treg细胞,并在各自的时间点收集细胞裂解物。现有技术抗体Biolegend L263G8和BD抗体433H均诱导磷酸化Erk1/2水平的显著增加,例如在激活的人Treg中15分钟后,本发明的抗体并非如此。

[0107] 图29:磷酸化AKT ELISA测定。用CCL1、TPP-23411、Biolegend L263G8或BD抗体

433H处理表达人CCR8的CHO细胞，并在各自的时间点收集细胞裂解物。

[0108] 图30：磷酸化AKT ELISA测定。用CCL1、TPP-23411、Biolegend L263G8或BD抗体433H处理表达CCR8的激活的人Treg细胞，并在各自的时间点收集细胞裂解物。现有技术抗体Biolegend L263G8和BD 433H均诱导激活的人Treg中磷酸化AKT水平的显著增加，例如15分钟后，而发明抗体的情况并非如此。

[0109] 图31：内化研究。a.商业抗人CCR8抗体Biolegend L263G8或BD抗体433H与内源性CCR8表达细胞系HuT78的FACS分析。b.基于细胞质强度点的商业抗人CCR8抗体与内源性CCR8表达细胞系HuT78的内化研究。TPP-5657：同种型对照。

[0110] 图32：内化研究。a.商业抗鼠CCR8抗体SA214G2与鼠内源性CCR8表达细胞系BW5147.3的FACS分析。b.商业抗鼠CCR8抗体SA214G2与鼠内源性CCR8表达细胞系BW5147.3的内化研究。抗鼠CCR8现有技术抗体SA214G2引发内化。

[0111] 图33：本发明的抗人CCR8抗体TPP-21360和TPP-23411与内源性表达CCR8的细胞系TALL-1(a)和HuT78(b)的内化研究。两种抗体都显示出相同的内化行为，与同种型对照TPP-5657相当。

[0112] 图34：本发明抗人CCR8抗体TPP-21360和TPP-23411与内源性CCR8表达细胞系TALL-1(a)和HuT78(b)的FACS分析。两种抗体都显示出与细胞系相同的结合效力。

[0113] 图35：代表一组全面的人类组织和细胞类型的11642个样本中的CCR8 mRNA表达，如affymetrix探针208059_at所测量。使用refRMA方法对所有样本进行共同归一化(Katz，Simon，et al."A summarization approach for Affymetrix GeneChip data using a reference training set from a large，biologically diverse database."BMC bioinformatics 7.1(2006)：1-11)。深灰色框着色表示相应组中的中值样本具有显著高于背景噪声的探针信号强度(由affymetrix的MAS5算法估计，参见Pepper，Stuart D.，et al."The utility of MAS5 expression summary and detection call algorithms."BMC bioinformatics 8.1(2007)：1-12)。显著高于背景噪声的中值CCR8表达仅在激活的调节性T细胞以及肿瘤浸润淋巴细胞中观察到。基于递减的平均表达对组进行排序。

[0114] 图36：在50种不同TCGA(https://www.cancer.gov/tcga)肿瘤适应症(深灰色方框)、相应的正常组织(白色方框)以及也按肿瘤适应症分组(浅灰色方框)的整个CCLE肿瘤细胞系图(Barretina，Jordi，et al."The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity."Nature 483.7391(2012)：603-607)中通过RNA-seq测量的CCR8 mRNA表达。根据中值表达对组进行排序。CCR8表达最高的适应症是乳腺癌、肺腺癌(ADC)和鳞状细胞癌(SCC)、头颈部恶性肿瘤以及食管肿瘤。在除胰腺腺癌和黑色素瘤外的所有适应症中，肿瘤中的表达与相应的正常组织相比更高。在上皮来源的相应肿瘤细胞系中观察到很少或没有表达，表明CCR8不由肿瘤细胞表达，而只由肿瘤浸润T细胞表达。原则上，具有CCR8+Treg细胞浸润的每个肿瘤适应症都应符合抗CCR8抗体治疗的条件。

[0115] 图37：人非小细胞肺癌组织(NSCLC)或人黑色素瘤组织中Treg标志物FOXP3和CCR8(克隆433H)的免疫组织化学染色。

[0116] 图38：基于CCR4、CCR8、OX40、GITR和CD25进行FACS分选的T细胞群进行染色。只有CCR8对激活的Tregs具有特异性。OX40、GITR和CD25在受刺激的CD8+Teff细胞和CD4+T细胞

(CD4+CD25+Foxp3-)上显著表达。深灰色:同种型对照,浅灰色:靶标染色。

[0117] 图39:通过单细胞RNA-seq所测量的在从不同肿瘤实体提取的不同T细胞亚群中的CCR8的表达。对于这些肿瘤,CCR8 mRNA的表达在很大程度上局限于肿瘤组织中的调节性T细胞(浅灰色框),而在正常组织以及CD4辅助T和CD8细胞毒性T细胞(分别为中灰色框和深灰色框)中的调节性T细胞中基本不存在。上小图:结直肠肿瘤组织(肿瘤)或邻近正常组织(正常)。中间小图:肝癌组织(肿瘤)或邻近正常组织(正常)。下小图:肺癌组织(肿瘤)或邻近的正常肺组织和外周血(正常)。样本大小N表示每个类别中的细胞数量。根据标志物基因FOXP3、CD4(但没有FOXP3)和CD8A/B的表达,分别将细胞指定为调节性T细胞、辅助性T细胞或细胞毒性T细胞。

[0118] 图40:来自NSCLC、CRC(结肠直肠癌)或RCC(肾癌)的Treg、巨噬细胞、T细胞或肿瘤细胞群用抗CCR8抗体或同种型对照染色,并通过流式细胞术进行分析。X轴:对数偏移最大10^5;Y轴:标准化为模式的强度。浅灰色:同种型对照。深灰色:CCR8。肿瘤内人Tregs上的特定CCR8表达由箭头指示。

[0119] 图41:用不同剂量的抗CCR8抗体或抗PDL1抗体处理后的CT26肿瘤生长。

[0120] 图42:在用不同剂量的抗CCR8抗体、抗PDL1抗体或同种型对照治疗后,携带CT26肿瘤的小鼠的蛛网图。

[0121] 图43:第二次抗体处理后24小时肿瘤内免疫细胞的FACS分析。瘤内Tregs的分析。对于10mg/kg、1mg/kg或0.1mg/kg,抗CCR8抗体TPP15285导致肿瘤内Treg平均减少至同种型对照中Treg的13%、33%或47%。对于10mg/kg、1mg/kg或0.1mg/kg,抗CCR8抗体TPP15286导致肿瘤内Treg平均减少至同种型对照中Treg的10%、9%或14%,参加表12.2.1,肿瘤内CD8+ T细胞的分析。表12.2.1CD8+T细胞与Treg细胞的比率的分析显示了同种型对照的平均增加百分比。抗CCR8抗体TPP15286导致CD8+细胞与Treg细胞的比率平均增加44(10mg/kg)、87(1mg/kg)或68(0.1mg/kg)。抗CCR8抗体TPP15285导致CD8+细胞与Treg细胞的比率平均增加64(10mg/kg)、16(1mg/kg)或10(0.1mg/kg)。分析CD4+conv T细胞与Treg细胞的比率。

[0122] 图44:用糖基化(TPP-14095、TPP-14099、TPP-15285、TPP-15286)或非糖基化(TPP-18208、TPP-18209)抗CCR8抗体处理后的CT26肿瘤生长。糖基化在很大程度上消除了抗肿瘤作用。

[0123] 图45:用糖基化(TPP-14095、TPP-14099、TPP-15285、TPP-15286)或非糖基化(TPP-18208、TPP-18209)抗CCR8抗体处理后的CT26荷瘤小鼠的蛛网图。糖基化在很大程度上消除了抗肿瘤作用,表明抗肿瘤功效的ADCC/ADCP依赖机制。

[0124] 图46:第二次抗体处理后24小时免疫细胞的FACS分析。肿瘤内CD45+细胞的绝对数量。肿瘤内CD45+CD8+ T细胞的绝对数量。肿瘤内CD8+ T细胞的绝对数量。肿瘤内CD4+conv细胞的绝对数量。通过流式细胞术对肿瘤内Treg耗竭的分析,显示绝对细胞数。抗体施用后相对于相应同种型对照的残余Treg的平均百分比对于TPP-14095为15.6%,对于TPP-14099为28.2%,对于TPP-15285为8.7%,对于TPP-15286为36.5%。对于非糖基化抗体,未观察到Treg减少。肿瘤内CD45+细胞中的CD8+ T细胞的百分比。CD8+ T细胞:Treg比率。CD4+conv:Treg比率。CD4+ T细胞的Treg细胞百分比。肿瘤内4-1BB+ Treg细胞的绝对数量。肿瘤内4-1BB+CD4+conv细胞的绝对数量。

[0125] 图47:用不同剂量的抗CCR8抗体TPP-15285处理后的EMT6肿瘤生长。显著性由1-

Way ANOVA加上对数转换后Sidak的post-test确定。

[0126] 图48:用不同剂量的抗CCR8抗体TPP-15285或抗CTLA4抗体处理后第19天的EMT6肿瘤生长。

[0127] 图49:用不同剂量的抗CCR8抗体TPP-15285或抗CTLA4抗体处理后的EMT6荷瘤小鼠的蛛网图。

[0128] 图50:用不同剂量的CCR8抗体TPP-15285或抗CTLA4抗体治疗后、第二次治疗后24小时或研究结束时,EMT6荷瘤小鼠免疫细胞的FACS分析。肿瘤内Treg细胞的绝对数量。观察到显著差异,例如在两个时间点使用10mg/kg的抗CCR8抗体。CD8阳性细胞与Treg的比率。CD4+conv细胞与Treg的比率。CD4+ T细胞中的Treg细胞百分比。

[0129] 图51:用不同剂量抗CCR8抗体TPP-15285或抗CTLA4抗体治疗后、第二次治疗后24小时或研究结束时,EMT6荷瘤小鼠免疫细胞的FACS分析。肿瘤内CD45+细胞的绝对数量。肿瘤内CD4+conv细胞的绝对数量。肿瘤内CD4+ T细胞的绝对数量。肿瘤内激活的CD8+ T细胞的绝对数量。肿瘤内NK细胞的绝对数量。肿瘤内CD8+ T细胞的绝对数量。观察到差异,例如在研究结束时使用10mg/kg的抗CCR8抗体。

[0130] 图52:不同剂量抗CCR8抗体TPP-15285或抗PDL1抗体处理后F9肿瘤生长情况。

[0131] 图53:开始用不同剂量的抗CCR8抗体TPP-15285或抗PDL1抗体治疗后第16天的F9肿瘤体积。至少对于10mg/kg的抗体剂量观察到显著改善。

[0132] 图54:不同剂量的抗CCR8抗体或抗PDL1抗体治疗后F9荷瘤小鼠的蛛网图。

[0133] 图55:第二次抗体处理24小时后,通过FACS分析的抗CCR8抗体或抗PDL1抗体对免疫细胞群及其在F9肿瘤中的比率的影响。与匹配的同种型对照相比,抗CCR8抗体增加了肿瘤内CD45+ T细胞、肿瘤内CD4+ T细胞、肿瘤内CD8+ T细胞、肿瘤内CD4+conv T细胞和肿瘤内NK细胞的绝对数量。10mg/kg的抗CCR8抗体降低了肿瘤内Treg细胞(CD4+、CD25+、FoxP3+)的绝对数量。

[0134] 图56:第二次处理后24小时通过FACS分析的抗CCR8抗体或抗PDL1抗体对免疫细胞群的影响及其在F9肿瘤中的比率,绘制为CD8+T细胞与Treg的比率、Treg与CD4+T细胞的频率,CD8+ T细胞中4-1BB+细胞的频率、Tregs中4-1BB+细胞的频率和常规CD4+ T细胞中4-1BB+细胞的频率。在10mg/kg时,抗CCR8抗体将CD8+细胞与Treg细胞的比率增加到大约54或更高,参见表12.5.1。

[0135] 图57:联合治疗在C38荷瘤小鼠中的功效。a.用抗CCR8替代抗体TPP-14099或TPP-15285或抗PD-L1抗体治疗后或与3mg/kg抗PDL1抗体、10mg/kg TPP-15285联合治疗后的C38肿瘤生长。显著性由1-Way ANOVA加上对数转换后Sidak的post-test确定。b.用抗鼠CCR8抗体TPP-15285(10mg/kg)、抗鼠PD-L1抗体(PDL1,3mg/kg)或TPP-1528(10mg/kg)和抗鼠PD-1抗体(3mg/kg)的组合处理后C38荷瘤小鼠的存活图。

[0136] 图58:通过流式细胞术分析C38肿瘤中的肿瘤Treg耗竭(第二抗体处理后24小时取样)。C38荷瘤小鼠接受抗CCR8替代抗体TPP-14099或TPP-15285或抗PD-L1抗体单药治疗,或TPP-15285与抗PD-L1抗体的联合治疗。绝对Treg耗竭。CD8+ T细胞/Treg细胞比率。

[0137] 图59:通过流式细胞术分析的C38肿瘤中的CD11+F4/80+巨噬细胞(研究结束时取样)。

[0138] 图60:用TPP-15285、抗CTLA4抗体或两者处理后的B16F10-OVA肿瘤生长。

[0139] 图61:用抗鼠CCR8抗体TPP-15285(1mg/kg)、抗鼠PD-1抗体(CDRs:atezolizumab,10mg/kg)或TPP-15285(1mg/kg)和抗鼠PD-1抗体(10mg/kg)的组合处理后的EMT-6肿瘤生长,(每周两次i.p.)。均值加标准差。

[0140] 图62:通过流式细胞术分析的EMT-6肿瘤中免疫细胞群的FACS分析,在第二次抗体处理后24小时取样。CD4+ T细胞、Treg、CD8+ T细胞、NK细胞、CD8+ T细胞与Treg的比率。方框和晶须(whisker),最小值到最大值与中值(GraphPad)。

[0141] 图63:用抗鼠CCR8抗体TPP-15285(5mg/kg)、抗鼠PD-1抗体(CDR:atezolizumab,5mg/kg)或TPP-15285(5mg/kg)和抗鼠PD-1抗体(5mg/kg)的组合处理后C38荷瘤小鼠的分析,(每周两次i.p.)。a.肿瘤体积。均值加标准差。b.存活图。

[0142] 图64:通过流式细胞术分析C38肿瘤中的肿瘤CD4+ T细胞、Treg、CD8+ T细胞、NK细胞或CD8+ T细胞与Treg的比率(第二次抗体治疗后24小时取样)。

[0143] 图65:单独使用抗CCR8抗体TPP-15285(10mg/kg)、单独使用抗PD-1抗体(aPD-1,CDRs:atezolizumab,10mg/kg)或TPP-1528(10mg/kg)和抗PD-1单抗(10mg/kg)的顺序组合治疗后的MB49肿瘤生长(均每周两次i.p.)。

[0144] 图66:通过流式细胞术分析MB49肿瘤中的CD45+细胞、Tregs、CD8+T细胞、NK细胞和CD8与Treg的比率(研究结束时取样)。

[0145] 图67:用抗CCR8抗体TPP-15285(5mg/kg,q3/4d i.p.)、奥沙利铂(5mg/kg、q4d i.p..)、多柔比星(6mg/kg,i.v.SD)、多烯紫杉醇(10mg/kg,q2dx5,i.v.)或TPP-15285与奥沙利铂、多柔比星或多烯紫杉醇的组合治疗后的EMT-6肿瘤生长。

[0146] 图68:用抗CCR8抗体TPP-15285、吉西他滨或TPP-15285与吉西他滨的组合治疗后的MB49肿瘤生长。

[0147] 图69:单独使用抗CCR8抗体TPP-15285(10mg/kg)、单独使用抗PD-1抗体(aPD-1,CDRs:atezolizumab,10mg/kg),单独使用抗PD-L1抗体(10mg/kg)、单独使用抗CTLA4抗体、TPP-15285(10mg/kg)和抗鼠PD-1抗体(10mg/kg)的组合或TPP-15285(10mg/kg)和抗PD-L1抗体的组合治疗后的Lewis肺肿瘤生长。

[0148] 图70:抗CCR8抗体TPP-15285(3mg/kg)或放疗(RT,3x2Gy)单独或联合治疗后的EMT-6肿瘤生长。显著性由1-Way ANOVA加上对数转换后Sidak的post-test确定。

[0149] 图71:用同种型对照(TPP-9809)或抗CCR8抗体(TPP-14099)处理的不同同基因肿瘤模型中不同免疫细胞标志物的mRNA表达水平。同种型治疗对照组中的中值表达设为零。通过RSEM算法估计,基因表达以百万分之一的转录物(TPM)测量。Treg标志物Foxp3。在用TPP-14099处理的CT26、H22、Hepa1-6和RM1模型中观察到明显更高的Foxp3水平,表明在施用至少三剂TPP-1409后Treg浸润增加。

[0150] 图72:炎症标志物lfng。在用TPP-14099处理的H22、CT26和RM1模型中观察到显著更高的lfng水平,表明TPP-1409诱导了强烈的促炎活性。

[0151] 图73:巨噬细胞标志物Ms4a7。在用TPP-14099处理的CT26、H22和Hepa1-6模型中观察到明显更高的Ms4a8水平,表明TPP-1409导致巨噬细胞浸润增加。

[0152] 图74:细胞毒性T细胞标志物Cd8a和Cd8b1。在用TPP-14099处理的CT26、H22、RM1和Hepa1-6模型中观察到明显更高的细胞毒性T淋巴细胞水平,表明TPP-1409诱导细胞毒性T细胞浸润和/或增殖。

[0153] 图75:自然杀伤(NK)细胞标志物Ncr1。在用TPP-14099处理的CT26、H22和Hepa1-6模型中观察到明显更高的NK细胞水平。

[0154] 图76:Pan T细胞标志物Cd3e/d/g。在用TPP-14099处理的CT26、H22和Hepa1-6模型中观察到明显更高的T细胞水平。

[0155] 图77:激活的Treg标志物和抗体靶标Ccr8。在用TPP-14099处理的CT26、H22和Hepa1-6模型中观察到显著更高的Ccr8水平。

[0156] 图78:高度特异性促炎性M1巨噬细胞标志物Acod1(a)和高度特异性抗炎性M2巨噬细胞标志物Mrc1(b)。在用TPP-14099处理的CT26、4T1、H22、Hepa1-6和RM1模型中观察到明显更高的M1巨噬细胞水平,而在用TPP-14099处理的所有模型中没有观察到明显更高的M2巨噬细胞水平。

[0157] 图79:高特异性促炎M1巨噬细胞标志物Acod1和高特异性抗炎M2巨噬细胞标志物Mrc1的比率。总之,多剂量的抗CCR8抗体TPP-14099增加了这些肿瘤模型中的M1/M2巨噬细胞比率。

[0158] 图80:B细胞标志物Cd19和Cd22。在用TPP-14099处理的CT26、H22、RM1和Hepa1-6模型中观察到明显更高的B细胞水平。抗CCR8抗体似乎将B细胞募集到肿瘤中。不受理论的束缚,B细胞的募集可能影响TPP-14099引发的抗肿瘤响应。

[0159] 图81:LTta/b以及Cxcr5及其配体Cxcl13的表达水平。这些标志物对于淋巴结和三级淋巴结构的发育至关重要(Cyster,Jason G."Blown away:the unexpected role of lymphotoxin in lymphoid organ development."The Journal of Immunology 192.5(2014):2007-2009.,and Cupedo,Tom,et al."Induction of secondary and tertiary lymphoid structures in the skin."Immunity 21.5(2004):655-667),这是人类抗肿瘤作用的关键驱动因素(参见Dieu-Nosjean,Marie-Caroline,et al."Tertiary lymphoid structures,drivers of the anti-tumor responses in human cancers."Immunological reviews 271.1(2016):260-275)。所有三篇公开文献的全部内容均通过引用并入本文。

[0160] 图82:不同肿瘤模型的TPP-14099处理组(显示为三角形)和同种型对照处理组(显示为圆圈)随时间推移的肿瘤生长(以mm3为单位)的蛛网图。根据相应大量肿瘤样本中的Cd8a mRNA水平判断的研究结束时的T细胞浸润水平用灰色阴影表示(黑色和浅灰色分别对应于最高和最低的Cd8a水平)。在H22和CT26中,肿瘤大小与Cd8a水平呈极好的反相关性。

[0161] 图83:根据不同免疫细胞标志物的mRNA水平判断的不同免疫细胞群对肿瘤的浸润与肿瘤大小之间的相关性。TPP-14099处理的肿瘤显示为三角形,同种型处理的肿瘤显示为圆圈。肿瘤大小以mm3为单位测量。细胞毒性T细胞浸润(根据Cd8a+Cd8b1 mRNA水平判断)与CT26肿瘤大小之间呈强负相关。与对照组相比,TPP-14099处理的肿瘤体积更小,并且显示出更高的Cd8a+Cd8b1 T细胞浸润水平,表明TPP-14099处理后增加的T细胞浸润导致肿瘤生长减少。在TPP-14099治疗的肿瘤中,T细胞浸润(通过Cd3 mRNA水平测量)与CT26肿瘤大小之间存在强负相关。TPP-14099处理的肿瘤体积更小,T细胞浸润水平更高,即Cd3 mRNA水平越高,肿瘤越小。NK细胞浸润(通过NK标志物Ncr1表达判断)与CT26肿瘤大小呈负相关。TPP-14099处理的肿瘤体积更小并显示更高的NK细胞浸润。肿瘤大小与NK浸润呈强烈负相关,NK水平越高,肿瘤越小。在TPP-14099处理的肿瘤中,根据Lta/Ltb/Cxcr5和Cxcl13 mRNA水平

判断的假定诱导三级淋巴结构与CT26肿瘤大小之间的相关性。对于四种标志物中的每一种，TPP-14099处理后其水平均显著增加，并且肿瘤大小与表达水平呈强烈负相关，表明TPP-14099处理后三级淋巴结构的形成增加导致肿瘤生长减少。

[0162] 图84：通过Cd8a mRNA表达判断的Cd8a浸润水平与TPP-14099处理的肿瘤(显示为三角形)和同种型处理的对照组(显示为圆圈)中不同肿瘤模型的肿瘤大小之间的相关性。TPP-1409处理的肿瘤体积更小，Cd8a浸润水平更高。肿瘤大小与Cd8a浸润呈强烈负相关，Cd8a水平越高，肿瘤越小。

[0163] 图85：CCR8抗体TPP-15285在用四种不同处理方案处理的EMT6肿瘤小鼠中的功效：单次治疗、两次BIW治疗、三次BIW治疗或四次BIW治疗。每组用载剂对照或0.1mg/kg、1mg/kg或5mg/kg的TPP-15285治疗。

[0164] 图86：如表12.6.9.1所示，在MBT2同基因肿瘤荷瘤小鼠中单独或组合测试的本发明抗CCR8抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体或紫杉醇的治疗效果。

[0165] 图87：在白喉毒素处理的DTR小鼠中CD8a+表达的定量耗竭后本发明的抗CCR8抗体的治疗功效。耗竭Cd8+T细胞消除TPP15825的抗肿瘤生长作用(参见02b组v.01b组)。

[0166] 图88：在白喉毒素处理的DTR小鼠中CD19+表达定量耗竭后本发明的抗CCR8抗体的治疗功效。耗竭Cd19+B细胞增强TPP15825的抗肿瘤生长作用(参见02b组v.01b组)。

[0167] 图89：HUVEC细胞中各种本发明的抗CCR8抗体的内化曲线。具有已知内化特征的抗CD71抗体用作阳性对照。相应数据见表10.5.2。用根据本发明的方法获得的抗体均未显示显著内化，这使得它们对基于ADCC/ADCP的方法特别有用。

[0168] SEQ ID的简要说明

[0169] 通过电子归档随申请提供的序列列表的全部内容包含在本文中。SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:108和SEQ ID NO:157至SEQ ID NO:168涉及可用作抗原或用于脱靶筛选的分离多肽。SEQ ID NO:109至SEQ ID NO:156涉及来自不同物种的趋化因子受体蛋白。SEQ ID NO:201至SEQ ID NO:965涉及本发明的抗体。硫酸化一栏仅为方便而提供，并不旨在以任何方式限制各自的序列。

[0170]

序列名称	序列区域	类型	SEQ ID	硫酸化
P32246_CCR1_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:1	Y10, Y18
Q2Y2P0_CCR1_MACFA_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:2	Y10, Y18
P51675_CCR1_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:3	Y10, Y18
P32246_CCR1_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:4	Y10, Y18
Q2Y2P0_CCR1_MACFA_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:5	Y10, Y18
P51675_CCR1_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:6	Y10, Y18
P41597_CCR2_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:7	**Y26**, Y28
O18793_CCR2_MACMU_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:8	Y26, Y28
P51683_CCR2_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:9	Y37, Y39
P41597_CCR2_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:10	**Y26**, Y28
O18793_CCR2_MACMU_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:11	Y26, Y28
P51683_CCR2_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:12	Y37, Y39
P51677_CCR3_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:13	Y16, Y17
Q9BDS8_CCR3_MACFA_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:14	Y16
P51678_CCR3_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:15	Y20, Y22
P51677_CCR3_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:16	Y16, Y17
Q9BDS8_CCR3_MACFA_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:17	Y16
P51678_CCR3_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:18	Y20, Y22
P51679_CCR4_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:19	(Y16, Y19, Y20), Y22
G7NYB7_CCR4_MACFA_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:20	(Y16, Y19, Y20), Y22
P51680_CCR4_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:21	(Y16, Y19, Y20), Y22
P51679_CCR4_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:22	(Y16, Y19, Y20), Y22
G7NYB7_CCR4_MACFA_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:23	(Y16, Y19, Y20), Y22
P51680_CCR4_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:24	(Y16, Y19, Y20), Y22
P51681_CCR5_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:25	**Y3, Y10, Y14, Y15**

	P61814_CCR5_MACFA_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:26	Y3, Y10, Y14, Y15
	P51682_CCR5_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:27	Y10, Y12, Y16
	P51681_CCR5_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:28	**Y3, Y10, Y14, Y15**
	P61814_CCR5_MACFA_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:29	Y3, Y10, Y14, Y15
	P51682_CCR5_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:30	Y10, Y12, Y16
	P51684_CCR6_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:31	Y18, Y26, Y27
	A0A2K5WY45_CCR6_MACFA_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:32	Y23, Y31, Y32
	O54689_CCR6_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:33	(Y7), Y13, Y18, Y19
	P51684_CCR6_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:34	Y18, Y26, Y27
	A0A2K5WY45_CCR6_MACFA_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:35	Y23, Y31, Y32
	O54689_CCR6_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:36	(Y7), Y13, Y18, Y19
	P32248_CCR7_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:37	Y8, Y17
	C0ISS3_CCR7_MACFA_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:38	Y8, Y17
	P47774_CCR7_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:39	Y8, Y17, Y20
	P32248_CCR7_人_N term (w/o Signal Peptide)	抗原	PRT	SEQ ID NO:40	Y8, Y17
	C0ISS3_CCR7_MACFA_N term (w/o Signal Peptide)	抗原	PRT	SEQ ID NO:41	Y8, Y17
	P47774_CCR7_小鼠_N term (w/o Signal Peptide)	抗原	PRT	SEQ ID NO:42	Y8, Y17, Y20
	P51685_CCR8_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:43	Y3, Y15, (16), Y17
	G7NYJ2_CCR8_MACFA_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:44	Y3, Y15, (16), Y17
[0171]	P56484_CCR8_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:45	Y3, **Y14, Y15**
	P51685_CCR8_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:46	Y3, Y15, (16), Y17
	G7NYJ2_CCR8_MACFA_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:47	Y3, Y15, (16), Y17
	P56484_CCR8_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:48	Y3, **Y14, Y15**
	P51685_CCR8_人_LID	抗原	PRT	SEQ ID NO:49	
	G7NYJ2_CCR8_MACFA_LID	抗原	PRT	SEQ ID NO:50	
	P56484_CCR8_小鼠_LID	抗原	PRT	SEQ ID NO:51	
	P51685_CCR8_人_ECL1	抗原	PRT	SEQ ID NO:52	
	G7NYJ2_CCR8_MACFA_ECL1	抗原	PRT	SEQ ID NO:53	
	P56484_CCR8_小鼠_ECL1	抗原	PRT	SEQ ID NO:54	
	P51685_CCR8_人_ECL2	抗原	PRT	SEQ ID NO:55	
	G7NYJ2_CCR8_MACFA_ECL2	抗原	PRT	SEQ ID NO:56	
	P56484_CCR8_小鼠_ECL2	抗原	PRT	SEQ ID NO:57	
	P51685_CCR8_人_ECL3	抗原	PRT	SEQ ID NO:58	
	G7NYJ2_CCR8_MACFA_ECL3	抗原	PRT	SEQ ID NO:59	
	P56484_CCR8_小鼠_ECL3	抗原	PRT	SEQ ID NO:60	
	P51686_CCR9_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:61	Y17, Y28, Y37
	Q0H741_CCR9_MACFA_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:62	Y17, Y28, Y37
	Q9WUT7_CCR9_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:63	Y19, Y28
	P51686_CCR9_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:64	Y17, Y28, Y37
	Q0H741_CCR9_MACFA_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:65	Y17, Y28, Y37
	Q9WUT7_CCR9_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:66	Y19, Y28
	P46092_CCR10_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:67	Y14, Y22
	A0A2K5UAP1_CCR10_MACFA_	抗原	PRT	SEQ ID NO:68	Y14, Y22

[0172]

TRD				
Q9JL21_CCR10_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:69	Y14, Y17, Y22
P46092_CCR10_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:70	Y14, Y22
A0A2K5UAP1_CCR10_MACFA_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:71	Y14, Y22
Q9JL21_CCR10_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:72	Y14, Y17, Y22
P25024_CXCR1_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:73	Y27
A0A2K5X9E4_CXCR1_MACFA_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:74	Y14, Y28
Q810W6_CXCR1_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:75	Y6, Y32
P25024_CXCR1_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:76	Y27
A0A2K5X9E4_CXCR1_MACFA_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:77	Y14, Y28
Q810W6_CXCR1_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:78	Y6, Y32
P25025_CXCR2_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:79	Y23, Y25
Q28519_CXCR2_MACMU_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:80	Y20, Y22
P35343_CXCR2_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:81	Y24
P25025_CXCR2_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:82	Y23, Y25
Q28519_CXCR2_MACMU_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:83	Y20, Y22
P35343_CXCR2_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:84	Y24
P49682_CXCR3_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:85	Y27, Y29
A0A2K5UV19_CXCR3_MACFA_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:86	Y27, Y29
O88410_CXCR3_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:87	Y2, Y27, Y29
P49682_CXCR3_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:88	Y27, Y29
A0A2K5UV19_CXCR3_MACFA_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:89	Y27, Y29
O88410_CXCR3_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:90	Y2, Y27, Y29
P61073_CXCR4_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:91	(Y7), **Y12, Y21**
Q28474_CXCR4_MACFA_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:92	(Y7), Y12, Y21
P70658_CXCR4_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:93	Y9, Y14, Y23
P61073_CXCR4_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:94	(Y7), **Y12, Y21**
Q28474_CXCR4_MACFA_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:95	(Y7), Y12, Y21
P70658_CXCR4_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:96	Y9, Y14, Y23
P32302_CXCR5_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:97	Y3, Y27
G8F5K4_CXCR5_MACFA_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:98	Y3, Y27
Q04683_CXCR5_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:99	Y3, Y14, Y20, Y26
P32302_CXCR5_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:100	Y3, Y27
G8F5K4_CXCR5_MACFA_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:101	Y3, Y27
Q04683_CXCR5_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:102	Y3, Y14, Y20, Y26
O00574_CXCR6_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:103	Y6, Y10
Q9BDS6_CXCR6_MACFA_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:104	Y4, Y7, Y39
Q9EQ16_CXCR6_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:105	Y11, (Y15)
O00574_CXCR6_人_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:106	Y6, Y10
Q9BDS6_CXCR6_MACFA_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:107	Y4, Y7, Y39
Q9EQ16_CXCR6_小鼠_N term	抗原	PRT	SEQ ID NO:108	Y11, (Y15)

[0173]

P32246_CCR1_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:109	
Q2Y2P0_CCR1_MACFA	抗原	PRT	SEQ ID NO:110	
P51675_CCR1_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:111	
P41597_CCR2_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:112	
O18793_CCR2_MACMU	抗原	PRT	SEQ ID NO:113	
P51683_CCR2_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:114	
P51677_CCR3_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:115	
Q9BDS8_CCR3_MACFA	抗原	PRT	SEQ ID NO:116	
P51678_CCR3_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:117	
P51679_CCR4_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:118	
G7NYB7_CCR4_MACFA	抗原	PRT	SEQ ID NO:119	
P51680_CCR4_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:120	
P51681_CCR5_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:121	
P61814_CCR5_MACFA	抗原	PRT	SEQ ID NO:122	
P51682_CCR5_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:123	
P51684_CCR6_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:124	
A0A2K5WY45_CCR6_MACFA	抗原	PRT	SEQ ID NO:125	
O54689_CCR6_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:126	
P32248_CCR7_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:127	
C0ISS3_CCR7_MACFA	抗原	PRT	SEQ ID NO:128	
P47774_CCR7_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:129	
P51685_CCR8_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:130	
G7NYJ2_CCR8_MACFA	抗原	PRT	SEQ ID NO:131	
P56484_CCR8_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:132	
P51686_CCR9_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:133	
Q0H741_CCR9_MACFA	抗原	PRT	SEQ ID NO:134	
Q9WUT7_CCR9_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:135	
P46092_CCR10_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:136	
A0A2K5UAP1_CCR10_MACFA	抗原	PRT	SEQ ID NO:137	
Q9JL21_CCR10_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:138	
P25024_CXCR1_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:139	
A0A2K5X9E4_CXCR1_MACFA	抗原	PRT	SEQ ID NO:140	
Q810W6_CXCR1_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:141	
P25025_CXCR2_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:142	
Q28519_CXCR2_MACMU	抗原	PRT	SEQ ID NO:143	
P35343_CXCR2_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:144	
P49682_CXCR3_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:145	
A0A2K5UV19_CXCR3_MACFA	抗原	PRT	SEQ ID NO:146	
O88410_CXCR3_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:147	
P61073_CXCR4_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:148	
Q28474_CXCR4_MACFA	抗原	PRT	SEQ ID NO:149	
P70658_CXCR4_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:150	
P32302_CXCR5_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:151	
G8F5K4_CXCR5_MACFA	抗原	PRT	SEQ ID NO:152	
Q04683_CXCR5_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:153	
O00574_CXCR6_人	抗原	PRT	SEQ ID NO:154	
Q9BDS6_CXCR6_MACFA	抗原	PRT	SEQ ID NO:155	

[0174]

Q9EQ16_CXCR6_小鼠	抗原	PRT	SEQ ID NO:156	
P49238_CX3CR1_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:157	Y14
Q6Y3J6_CX3CR1_MACFA_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:158	Y20
Q9Z0D9_CX3CR1_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:159	Y15
P49238_CX3CR1_人_N Term	抗原	PRT	SEQ ID NO:160	Y14, Y22
Q6Y3J6_CX3CR1_MACFA_N Term	抗原	PRT	SEQ ID NO:161	Y20, Y22
Q9Z0D9_CX3CR1_小鼠_N Term	抗原	PRT	SEQ ID NO:162	Y15, Y23
P25024_CXCR1_人_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:163	Y27
Q2YEG0_CXCR1_MACMU_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:164	Y14, Y28
Q810W6_CXCR1_小鼠_TRD	抗原	PRT	SEQ ID NO:165	Y6, Y32
P25024_CXCR1_人_N Term	抗原	PRT	SEQ ID NO:166	Y27
Q2YEG0_CXCR1_MACMU_N Term	抗原	PRT	SEQ ID NO:167	Y14, Y28, Y41
Q810W6_CXCR1_小鼠_N Term	抗原	PRT	SEQ ID NO:168	Y6, Y32

[0175]

TPP ID	序列名称	序列区域	类型	SEQ ID
TPP-14095	497A-M005-E07 -hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:201
TPP-14095	497A-M005-E07 -hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:202
TPP-14095	497A-M005-E07 -hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:203
TPP-14095	497A-M005-E07 -hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:204
TPP-14095	497A-M005-E07 -hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:205
TPP-14095	497A-M005-E07 -hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:206
TPP-14095	497A-M005-E07 -hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:207
TPP-14095	497A-M005-E07 -hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:208
TPP-14095	497A-M005-E07 -hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:209
TPP-14095	497A-M005-E07 -hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:210
TPP-14095	497A-M005-E07 -hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:211
TPP-14095	497A-M005-E07 -hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:212
TPP-14095	497A-M005-E07 -hIgG1Lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:213
TPP-14095	497A-M005-E07 -hIgG1Lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:214
TPP-14099	497A-M005-F02 -hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:215
TPP-14099	497A-M005-F02 -hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:216
TPP-14099	497A-M005-F02 -hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:217
TPP-14099	497A-M005-F02 -hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:218
TPP-14099	497A-M005-F02 -hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:219
TPP-14099	497A-M005-F02 -hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:220
TPP-14099	497A-M005-F02 -hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:221
TPP-14099	497A-M005-F02 -hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:222
TPP-14099	497A-M005-F02 -hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:223
TPP-14099	497A-M005-F02 -hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:224
TPP-14099	497A-M005-F02 -hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:225
TPP-14099	497A-M005-F02 -hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:226
TPP-14099	497A-M005-F02 -hIgG1Lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:227
TPP-14099	497A-M005-F02 -hIgG1Lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:228
TPP-15285	497A-M005-F02-mIgG2aLambda	VH	PRT	SEQ ID NO:229
TPP-15285	497A-M005-F02-mIgG2aLambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:230
TPP-15285	497A-M005-F02-mIgG2aLambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:231
TPP-15285	497A-M005-F02-mIgG2aLambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:232
TPP-15285	497A-M005-F02-mIgG2aLambda	VL	PRT	SEQ ID NO:233

[0176]

TPP-15285	497A-M005-F02-mIgG2aLambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:234
TPP-15285	497A-M005-F02-mIgG2aLambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:235
TPP-15285	497A-M005-F02-mIgG2aLambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:236
TPP-15285	497A-M005-F02-mIgG2aLambda	VH	DNA	SEQ ID NO:237
TPP-15285	497A-M005-F02-mIgG2aLambda	VL	DNA	SEQ ID NO:238
TPP-15285	497A-M005-F02-mIgG2aLambda	HC	PRT	SEQ ID NO:239
TPP-15285	497A-M005-F02-mIgG2aLambda	LC	PRT	SEQ ID NO:240
TPP-15285	497A-M005-F02-mIgG2aLambda	HC	DNA	SEQ ID NO:241
TPP-15285	497A-M005-F02-mIgG2aLambda	LC	DNA	SEQ ID NO:242
TPP-15286	497A-M005-E07-mIgG2aLambda	VH	PRT	SEQ ID NO:243
TPP-15286	497A-M005-E07-mIgG2aLambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:244
TPP-15286	497A-M005-E07-mIgG2aLambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:245
TPP-15286	497A-M005-E07-mIgG2aLambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:246
TPP-15286	497A-M005-E07-mIgG2aLambda	VL	PRT	SEQ ID NO:247
TPP-15286	497A-M005-E07-mIgG2aLambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:248
TPP-15286	497A-M005-E07-mIgG2aLambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:249
TPP-15286	497A-M005-E07-mIgG2aLambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:250
TPP-15286	497A-M005-E07-mIgG2aLambda	VH	DNA	SEQ ID NO:251
TPP-15286	497A-M005-E07-mIgG2aLambda	VL	DNA	SEQ ID NO:252
TPP-15286	497A-M005-E07-mIgG2aLambda	HC	PRT	SEQ ID NO:253
TPP-15286	497A-M005-E07-mIgG2aLambda	LC	PRT	SEQ ID NO:254
TPP-15286	497A-M005-E07-mIgG2aLambda	HC	DNA	SEQ ID NO:255
TPP-15286	497A-M005-E07-mIgG2aLambda	LC	DNA	SEQ ID NO:256
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:257
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:258
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:259
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:260
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:261
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:262
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:263
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:264
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:265
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:266
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:267
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:268
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:269
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:270
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:271
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:272
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:273
TPP-16966	15291-deglyco-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:274
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:275
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:276
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:277
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:278
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:279
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:280
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:281
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:282
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:283
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:284
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:285

[0177]

TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:286
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:287
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:288
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:289
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:290
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:291
TPP-17575	497A-M181-C17-1-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:292
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:293
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:294
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:295
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:296
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:297
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:298
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:299
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:300
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:301
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:302
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:303
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:304
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:305
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:306
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:307
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:308
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:309
TPP-17576	497A-M136-O21-1-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:310
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:311
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:312
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:313
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:314
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:315
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:316
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:317
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:318
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:319
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:320
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:321
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:322
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:323
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:324
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:325
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:326
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:327
TPP-17577	497A-M178-K09-1-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:328
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:329
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:330
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:331
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:332
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:333
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:334
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:335
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:336
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:337

[0178]

TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:338
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:339
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:340
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:341
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:342
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:343
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:344
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:345
TPP-17578	497A-M128-B10-1-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:346
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:347
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:348
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:349
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:350
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:351
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:352
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:353
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:354
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:355
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:356
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:357
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:358
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:359
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:360
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:361
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:362
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:363
TPP-17579	497A-M180-K04-1-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:364
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:365
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:366
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:367
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:368
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:369
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:370
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:371
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:372
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:373
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:374
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:375
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:376
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:377
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:378
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:379
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:380
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:381
TPP-17580	497A-M193-A08-1-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:382
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:383
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:384
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:385
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:386
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:387
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:388
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:389

[0179]

TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:390
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:391
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:392
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:393
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:394
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:395
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:396
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:397
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:398
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:399
TPP-17581	497A-M177-L03-1-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:400
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:401
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:402
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:403
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:404
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:405
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:406
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:407
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:408
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:409
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:410
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:411
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:412
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:413
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:414
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:415
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:416
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:417
TPP-18205	004-F10_497A-M296-L12+497A-M326-O09-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:418
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:419
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:420
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:421

[0180]

TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:422
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:423
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:424
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:425
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:426
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:427
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:428
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:429
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:430
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:431
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:432
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:433
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:434
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:435
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:436
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:437
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:438
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:439
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:440
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:441
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:442
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:443
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:444
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:445
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:446
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:447
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:448

[0181]

	D16-hIgG1Lambda			
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:449
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:450
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:451
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:452
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:453
TPP-18207	001-B08_497A-M301-B18+497A-M316-D16-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:454
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:455
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:456
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:457
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:458
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:459
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:460
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:461
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:462
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:463
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:464
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:465
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:466
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:467
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:468
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:469
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:470
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:471
TPP-19546	17578-gl33-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:472
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:473
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:474
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:475
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:476
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:477
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:478
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:479
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:480
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:481
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:482
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:483
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:484
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:485
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:486
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:487
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:488
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:489
TPP-20950	18206-gl-42-hIgG1wt-Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:490
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:491
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:492
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:493
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:494

[0182]

TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:495
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:496
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:497
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:498
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:499
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:500
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:501
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:502
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:503
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:504
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:505
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:506
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:507
TPP-20955	18206-gl-47-hIgG1wt-Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:508
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:509
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:510
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:511
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:512
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:513
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:514
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:515
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:516
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:517
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:518
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:519
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:520
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:521
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:522
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:523
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:524
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:525
TPP-20965	18206-gl-58-hIgG1wt-Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:526
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:527
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:528
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:529
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:530
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:531
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:532
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:533
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:534
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:535
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:536
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:537
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:538
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:539
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:540
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:541
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:542
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:543
TPP-21045	17578-gl79-hIgG1-wt-Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:544
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:545
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:546

[0183]

TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:547
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:548
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:549
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:550
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:551
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:552
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:553
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:554
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:555
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:556
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:557
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:558
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:559
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:560
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:561
TPP-21047	17578-gl81-hIgG1-wt-Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:562
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:563
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:564
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:565
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:566
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:567
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:568
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:569
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:570
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:571
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:572
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:573
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:574
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:575
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:576
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:577
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:578
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:579
TPP-21181	18205-gl46 -hIgG1-wt-Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:580
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:581
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:582
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:583
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:584
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:585
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:586
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:587
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:588
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:589
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:590
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:591
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:592
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:593
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:594
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:595
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:596
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:597
TPP-21183	18205-gl48 -hIgG1-wt-Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:598

[0184]

TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:599
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:600
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:601
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:602
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:603
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:604
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:605
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:606
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:607
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:608
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:609
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:610
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:611
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:612
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:613
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:614
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:615
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:616
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	VH	PRT	SEQ ID NO:617
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:618
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:619
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:620
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	VL	PRT	SEQ ID NO:621
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:622
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:623
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:624
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	VH	DNA	SEQ ID NO:625
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:626
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:627
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:628
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	VL	DNA	SEQ ID NO:629
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:630
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:631
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:632
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	HC	PRT	SEQ ID NO:633
TPP-23411	21360-hIgG1wtlambda	LC	PRT	SEQ ID NO:634
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	VH	PRT	SEQ ID NO:660
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:661
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:662
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:663
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	VL	PRT	SEQ ID NO:664
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:665
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:666
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:667
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	VH	DNA	SEQ ID NO:668
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:669
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:670
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:671
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	VL	DNA	SEQ ID NO:672
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:673
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:674
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:675

[0185]

TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	HC	PRT	SEQ ID NO:676
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	LC	PRT	SEQ ID NO:677
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	HC	DNA	SEQ ID NO:678
TPP-29596	18206-gl13-gl14-hIgG1wtLambda	LC	DNA	SEQ ID NO:679
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	VH	PRT	SEQ ID NO:680
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:681
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:682
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:683
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	VL	PRT	SEQ ID NO:684
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:685
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:686
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:687
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	VH	DNA	SEQ ID NO:688
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:689
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:690
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:691
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	VL	DNA	SEQ ID NO:692
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:693
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:694
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:695
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	HC	PRT	SEQ ID NO:696
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	LC	PRT	SEQ ID NO:697
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	HC	DNA	SEQ ID NO:698
TPP-29597	18206-gl11-gl25-hIgG1wtLambda	LC	DNA	SEQ ID NO:699
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:700
TPP-18206	002-F01_497A-M281-P02+497A-M317-O07-hIgG1Lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:701
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:702
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:703
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:704
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:705
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:706
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:707
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:708
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:709
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:710
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:711
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:712
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:713
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:714
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:715
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:716
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:717
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:718
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:719
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:720
TPP-18429	18206-gl10-hIgG1Lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:721
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:722
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:723
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:724
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:725

[0186]

TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:726
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:727
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:728
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:729
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:730
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:731
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:732
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:733
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:734
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:735
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:736
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:737
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:738
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:739
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:740
TPP-18430	18206-gl11-hIgG1Lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:741
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:742
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:743
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:744
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:745
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:746
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:747
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:748
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:749
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:750
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:751
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:752
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:753
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:754
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:755
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:756
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:757
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:758
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:759
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:760
TPP-18432	18206-gl13-hIgG1Lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:761
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:762
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:763
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:764
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:765
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:766
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:767
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:768
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:769
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:770
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:771
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:772
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:773
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:774
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:775
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:776
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:777

[0187]

TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:778
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:779
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:780
TPP-18433	18206-gl14-hIgG1Lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:781
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:782
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:783
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:784
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:785
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:786
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:787
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:788
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:789
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:790
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:791
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:792
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:793
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:794
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:795
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:796
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:797
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:798
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:799
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:800
TPP-18436	18206-gl17-hIgG1Lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:801
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:802
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:803
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:804
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:805
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:806
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:807
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:808
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:809
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:810
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:811
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:812
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:813
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:814
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:815
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:816
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:817
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:818
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:819
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:820
TPP-19571	18206-gl25-hIgG1Lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:821
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:822
TPP-21360	18206-gl25-gl13-hIgG1Lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:823
TPP-23411	21360-hIgG1lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:824
TPP-23411	21360-hIgG1lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:825
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:826
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:827
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:828
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:829

[0188]

TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:830
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:831
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:832
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:833
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:834
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:835
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:836
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:837
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:838
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:839
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:840
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:841
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:842
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:843
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:844
TPP-27477	18206-gl10-gl25-hIgG1Lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:845
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:846
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:847
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:848
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:849
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:850
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:851
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:852
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:853
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:854
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:855
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:856
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:857
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:858
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:859
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:860
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:861
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:862
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:863
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:864
TPP-27478	18206-gl11-gl25-hIgG1Lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:865
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:866
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:867
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:868
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:869
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:870
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:871
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:872
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:873
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:874
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:875
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:876
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:877
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:878
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:879
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:880
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:881

[0189]

TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:882
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:883
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:884
TPP-27479	18206-gl13-gl14-hIgG1Lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:885
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	VH	PRT	SEQ ID NO:886
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:887
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:888
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:889
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	VL	PRT	SEQ ID NO:890
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:891
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:892
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:893
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	VH	DNA	SEQ ID NO:894
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:895
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:896
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:897
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	VL	DNA	SEQ ID NO:898
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:899
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:900
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:901
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	HC	PRT	SEQ ID NO:902
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	LC	PRT	SEQ ID NO:903
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	HC	DNA	SEQ ID NO:904
TPP-27480	18206-gl13-gl20-hIgG1Lambda	LC	DNA	SEQ ID NO:905
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	VH	PRT	SEQ ID NO:906
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:907
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:908
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:909
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	VL	PRT	SEQ ID NO:910
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:911
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:912
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:913
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	VH	DNA	SEQ ID NO:914
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:915
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:916
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:917
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	VL	DNA	SEQ ID NO:918
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:919
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:920
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:921
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	HC	PRT	SEQ ID NO:922
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	LC	PRT	SEQ ID NO:923
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	HC	DNA	SEQ ID NO:924
TPP-29367	18206-hIgG1wtLambda	LC	DNA	SEQ ID NO:925
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	VH	PRT	SEQ ID NO:926
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:927
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:928
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:929
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	VL	PRT	SEQ ID NO:930
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:931
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:932
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:933

[0190]

TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	VH	DNA	SEQ ID NO:934
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:935
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:936
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:937
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	VL	DNA	SEQ ID NO:938
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:939
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:940
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:941
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	HC	PRT	SEQ ID NO:942
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	LC	PRT	SEQ ID NO:943
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	HC	DNA	SEQ ID NO:944
TPP-29368	18432-hIgG1wtLambda	LC	DNA	SEQ ID NO:945
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	VH	PRT	SEQ ID NO:946
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	HCDR1	PRT	SEQ ID NO:947
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	HCDR2	PRT	SEQ ID NO:948
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	HCDR3	PRT	SEQ ID NO:949
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	VL	PRT	SEQ ID NO:950
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	LCDR1	PRT	SEQ ID NO:951
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	LCDR2	PRT	SEQ ID NO:952
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	LCDR3	PRT	SEQ ID NO:953
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	VH	DNA	SEQ ID NO:954
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	HCDR1	DNA	SEQ ID NO:955
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	HCDR2	DNA	SEQ ID NO:956
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	HCDR3	DNA	SEQ ID NO:957
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	VL	DNA	SEQ ID NO:958
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	LCDR1	DNA	SEQ ID NO:959
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	LCDR2	DNA	SEQ ID NO:960
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	LCDR3	DNA	SEQ ID NO:961
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	HC	PRT	SEQ ID NO:962
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	LC	PRT	SEQ ID NO:963
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	HC	DNA	SEQ ID NO:964
TPP-29369	19571-hIgG1wtlambda	LC	DNA	SEQ ID NO:965

[0191] 定义

[0192] 除非另有定义，说明书、附图和权利要求中使用的所有科学和技术术语具有本领域普通技术人员通常理解的普通含义。本文中提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献的全部内容通过引用并入本文。如有冲突，应以本说明书(包括定义)为准。如果通过引用并入的两个或多个文件包含相互冲突和/或不一致的公开，则以生效日期较晚的文件为准。如果参考了数据库，则有效数据应为适用于2021年5月26日的版本号，除非另有说明。材料、方法和实施例仅是说明性的，并非旨在限制。除非另有说明，本文件中使用的以下术语，包括说明书和权利要求书，具有以下定义。

[0193] 此处使用的表达式“约”或“～”是指本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内的值，这将部分取决于如何测量或确定该值，即取决于测量系统的限制。例如，根据本领域的实践，“约”可以表示在1个或1个以上的标准偏差内。术语“约”也用于表示所讨论的量或值可以是指定的值或近似相同的其他值。该短语旨在传达类似的值促进如本文所述的等同结果或效果。在这种情况下，“约”可以指高于和/或低于至多10％的范围。无论何时为某一测定或实施方式指定术语“约”，该定义均适用于特定上下文。

[0194] 术语“包括”、“包含”、“含有”、“具有”等应扩展或开放式地阅读。当在说明书中使用时，术语“包括”包括“由…组成”。

[0195] 单数形式如“一个/一种(a/an)”或“所述/该(the)”包括复数引用，除非上下文另

有明确说明。因此，例如，提及“单克隆抗体”包括单一单克隆抗体以及多种相同或不同的单克隆抗体。同样，“细胞”包括单一细胞和多种细胞。

[0196] 除非另有说明，否则一系列元素之前的术语“至少”应理解为指向该系列中的每个元素。术语“至少一种”和“至少其中一种”包括例如一种、两种、三种、四种、五种或更多种元素。

[0197] 还应理解，高于和低于规定范围的轻微变化可用于实现与该范围内的值基本相同的结果。此外，除非另有指示，否则范围的公开旨在作为包括最小值和最大值之间的每个值的连续范围。

[0198] 本文中使用的术语“氨基酸”或“氨基酸残基”通常指天然存在的氨基酸。这里使用一个字母的代码来指代相应的氨基酸。如本文所用，“带电氨基酸”是带负电或带正电的氨基酸。“带负电荷的氨基酸”是天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)。“带正电荷的氨基酸”是精氨酸(R)、赖氨酸(K)和组氨酸(H)。“极性氨基酸”是所有作为供体或受体形成氢键的氨基酸。这些都是带电荷的氨基酸和天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、酪氨酸(Y)和半胱氨酸(C)。“极性不带电氨基酸”是天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、酪氨酸(Y)和半胱氨酸(C)。“两基氨基酸”是色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和蛋氨酸(M)。“芳香氨基酸”是苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)。“疏水性氨基酸”是甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)、苯丙氨酸(F)、蛋氨酸(M)和半胱氨酸。“小氨基酸”是甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、脯氨酸(P)、苏氨酸(T)、天冬氨酸(D)和天冬酰胺(N)。

[0199] 如本文所用，术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用，并指由肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。一种蛋白质或肽必须至少包含两个氨基酸，并且对氨基酸的最大数量没有限制。多肽包括包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所使用的，该术语既指短链(其在本领域中也通常被称为例如肽、寡肽和低聚物)，又指长链，长链通常在本领域被称为蛋白质，具有多种类型。“多肽”包括，例如，生物活性片段、基本同源多肽、寡肽、同源二聚体、异二聚体，多肽变体、修饰多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或其组合。

[0200] 如果对某一物种(如小鼠)的基因或蛋白质进行了一般性引用，则除非另有说明或明显不兼容，否则同样应指人类的类似物。这尤其适用于生物标志物。

[0201] 当应用于核酸、多肽、蛋白质或抗体时，术语“分离的”表示该核酸、多肽或蛋白质或抗体基本上不含在自然状态下与其相关的其他细胞成分。它优选处于均匀状态。它可以是干溶液或水溶液。纯度和均一性通常使用聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱等分析化学技术来确定。作为制剂中存在的主要物质的蛋白质、多肽或抗体被实质上纯化。特别是，分离的基因与基因侧翼并编码感兴趣基因以外的蛋白质的开放阅读框分离。然而，分离的多肽可以例如通过合适的接头固定在珠或颗粒上。

[0202] 术语“纯化”表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中基本上产生一条带。特别地，这意味着核酸或蛋白质是至少85％纯度，更优选地至少95％纯度，最优选地至少99％纯度。

[0203] 如本文所使用的，术语“合成”，例如合成核酸分子或合成基因或合成肽是指通过重组方法和/或化学合成方法产生的核酸分子或多肽分子。如本文所使用的，通过使用重组DNA方法的重组手段生产意味着使用众所周知的分子生物学方法来表达由克隆DNA编码的

蛋白质。

[0204] “翻译后修饰”(PTM)是指肽或蛋白质的共价修饰,这些修饰是在自然条件下蛋白质生物合成后引入的。该术语包括但不限于糖基化、磷酸化、酰化、腺嘌呤化、法尼酰化、泛素化和硫酸化。翻译后修饰可能影响肽或蛋白质的活性。2004年,Gutiérrez等描述了小鼠CCR8趋化因子受体的硫酸化和糖基化状态,以及这些翻译后修饰影响CCR8活性的方式。他们认为,小鼠CCR8第14和15位的酪氨酸是硫酸化的氨基酸残基,而天冬酰胺8和苏氨酸10和12被糖基化的。此外,他们表明,硫酸化对CCR8的活性很重要(Gutiérrez,Julio,et al.″Analysis of post-translational CCR8 modifications and their influence on receptor activity.″Journal of Biological Chemistry 279.15(2004):14726-14733)。

[0205] “硫酸化”是一种翻译后修饰,其中硫酸基团被添加到氨基酸中,如多肽或蛋白质的酪氨酸残基。酪氨酸硫酸化发生在所有多细胞生物中。在生理条件下,它由酪氨酸蛋白硫转移酶(TPSTs)1和2催化,这是将硫酸盐从辅因子PAPS(3′-磷酸腺苷5′-磷酸硫酸盐)转移到蛋白质底物中的环境依赖性酪氨酸的高尔基体驻留酶。酪氨酸的合成硫酸化可以用本领域已知的技术进行,例如Bunschoten,Anton,et al.″A general sequence independent solid phase method for the site specific synthesis of multiple sulfated-tyrosine containing peptides.″Chemical Communications 21(2009):2999-3001所描述。硫酸化多肽是包含至少一种硫酸化的多肽。非硫酸化多肽是不含硫酸化的多肽。

[0206] “富含酪氨酸的结构域”(TRD)是一个保守的结构域,它表征了七次跨膜蛋白,例如CXC和CC趋化因子受体。TRD通常位于趋化因子受体的N端,并且通常通过半胱氨酸连接到LID结构域,参见图2b。因此,如本文所用,术语TRD是指CXC或CC趋化因子的氨基酸或蛋白质序列,其位于从N端计数的第一个半胱氨酸的N端。TRD可以或可以不包括信号肽。TRD可以修改,也可以不修改。除酪氨酸外,TRD通常包含带负电的氨基酸残基,如天冬氨酸。TRD被认为是趋化因子受体与其内源性配体相互作用的重要结构。在生理条件下,TRD中的酪氨酸残基可以硫酸化、非硫酸化或部分硫酸化。表4.1中提供了相应趋化因子受体TRD的特定序列。然而,很明显,在TRD序列中可以引入突变,而不会改变整体电荷和相互作用模式。优选地,根据表4.1,TRD与至少一个TRD序列具有至少90%、95%或99%的序列同一性或序列相似性。

[0207] 本文所用的趋化因子受体的术语“N末端/N端”是指至少包含TRD的趋化因子受体的N端氨基酸。当多肽或蛋白质包含信号肽时,N端也可以指多肽或蛋白质的天然切割位点后面的N端序列。根据一些优选实施方式,N端包含趋化因子受体的LID结构域和TRD结构域,但不包含这两个结构域之间的天然半胱氨酸。相反,半胱氨酸可以被去除或被不同的氨基酸取代。

[0208] 本文所用的趋化因子受体的“LID”结构域是指位于趋化因子受体TRD的C端的氨基酸序列。TRD和LID结构域通常由单个半胱氨酸分隔。

[0209] “序列同一性”或“百分比同一性”是一个数字,描述查询序列与目标序列的相似程度,更准确地说,每个序列中有多少字符在比对后是相同的。计算序列同一性的最流行的工具是BLAST(基本局部比对搜索工具,https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/),其执行序列对之间的比较,搜索局部相似性区域。合适的比对方法是本领域已知的,例如用于全局比对的Needleman-Wunsch算法,其使用BLOSUM62矩阵,缺口开放惩罚为11,缺口扩展惩罚为1,可以对比对的相同残基对进行计数,然后除以比对的总长度(包括内部和外部的缺口),得出同

一性百分比值。

[0210] 对于“百分比相似性”或“序列相似性”值,可以使用与百分比同一性值相同的方法,除了计算的是具有非负值的BLOSUM62值的比对残基对,而不是相同残基对(即≥0)。

[0211] “七次跨膜受体”(7-TM受体)是包含七次跨膜螺旋的完整膜蛋白。如本文所用,7-TM受体是G蛋白偶联受体。

[0212] “趋化因子受体”是七次跨膜受体。趋化因子受体家族在人类中包含24个成员,根据它们结合的趋化因子的种类,可以细分为四个亚家族:CX3CR、CXCR、CCR和XCR,它们都激活G蛋白,ACKR包含6个非典型受体,在配体结合时不能激活G蛋白。

[0213] “CXC趋化因子受体”(CXCR)是一种特异性结合并响应CXC趋化因子家族的细胞因子的完整的膜蛋白。它们代表趋化因子受体的一个亚家族,因为跨越细胞膜七次被称为七次跨膜(7-TM)蛋白的G蛋白连接受体的大家族。目前,哺乳动物中已知有七种CXC趋化因子受体,分别命名为CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5和CXCR6。CXCR6在结构上与CC趋化因子受体比与其他CXC趋化因子受体更密切相关。

[0214] “CC趋化因子受体”(CCR,也称为β趋化因子受体)是一种特异性结合并响应CC趋化因子家族的细胞因子的完整的膜蛋白。它们代表趋化因子受体的一个亚家族,因为跨越细胞膜七次被称为七次跨膜(7-TM)蛋白的G蛋白连接受体的大家族。CC趋化因子受体的亚家族包括CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9和CCR10。

[0215] 术语“CCR8”是指C-C趋化因子受体类型8。CCR8蛋白由基因CCR8(NCBI基因ID 1237)编码。CCR8的同义词尤其是CC-CKR-8、CCR-8、CDw198、CKRL1、CMKBR8、CMKBRL2、GPRCY6、CY6、TER1。CCR8蛋白包括人、鼠、大鼠、恒河猴以及其他哺乳动物和非哺乳动物同源物。人类CCR8的序列可通过UniProt标识符P51685(CCR8_human)访问,例如人类同种型P51685-1或P51685-2(UniProt,2019年11月29日)。鼠CCR8的序列可通过UniProt标识符P56484(CCR8_MOUSE)访问。恒河猴CCR8的序列可通过UniProt标识符O97665(CCR8_MACMU)访问。不同物种可能存在不同的同种型和变体,并且都由术语CCR8组成。也包括成熟前后的CCR8分子,即独立于一个或多个前结构域的切割。此外,可以产生CCR8蛋白的合成变体,并被术语CCR8包含。此外,CCR8蛋白质可以进行各种修饰,例如,合成或天然发生的修饰,例如翻译后修饰。重组人CCR8可商购或可如本领域已知的那样制造。CCR8是趋化因子CCL1/SCJA1/I-309的受体。Barington等报道了细胞外环2(ECL-2)中保守的胞外二硫桥和芳香残基对于趋化因子受体CCR8中配体结合和激活的重要性(Barington,Line,et al.″Role of conserved disulfide bridges and aromatic residues in extracellular loop 2 of chemokine receptor CCR8 for chemokine and small molecule binding.″Journal of Biological Chemistry 291.31(2016):16208-16220)。此外,他们发现ECL-2中的两个不同的芳香族残基,Tyr184(Cys+1)和Tyr187(Cys+4),分别对CC趋化因子CCL1(激动剂)和MC148(拮抗剂)的结合至关重要,但对小分子的结合不重要。

[0216] “程序性死亡-1(PD-1)”是指属于CD28家族的免疫抑制受体。PD-1主要在体内先前激活的T细胞上表达,并与两种配体PD-L1和PD-L2结合。本文中使用的术语“PD-1”包括但不限于人PD-1(hPD-1)、hPD-1的变体、同种型和物种同源物,以及与hPD-1具有至少一个共同表位的类似物。完整的hPD-1序列可在GenBank登录号U64863(2019年11月29日)中找到。

[0217] “程序性死亡配体-1(PD-L1)”是PD-1的两种细胞表面糖蛋白配体之一(另一种是

PD-L2)，其在与PD-1结合时下调T细胞激活和细胞因子分泌。本文中使用的术语“PD-L1”包括但不限于人PD-L1(hPDL1)、hPD-L1的变体、同种型和物种同源物，以及与hPD-L1具有至少一个共同表位的类似物。完整的hPD-L1序列可以在GenBank登录号Q9NZQ7(2019年11月29日)中找到。

[0218] “肿瘤比例评分”(TPS)是在任何强度下显示部分或完全膜染色的活肿瘤细胞的百分比。例如，如果TPS≥1％，则应认为样本具有PD-L1表达；如果TPS≥50％，则应认为样本具有高PDL1表达。例如，NSCLC中的PD-L1蛋白表达通常通过使用肿瘤比例评分(TPS)来确定。

[0219] “组合阳性分数”(CPS)是指染色细胞(肿瘤细胞、淋巴细胞、巨噬细胞)的数量除以活肿瘤细胞总数，乘以100。例如，如果CPS≥1，则样本应被视为具有PD-L1表达；如果CPS≥10，则样本应被视为具有高PD-L1表达。FDA已批准使用PD-L1 IHC 22C3 pharmDx测定来确定患者的治疗性抗体pembrolizumab的适用性。

[0220] “FOXP3”是一种50-55kD的转录因子，也称为Forkhead box蛋白P3、Scurfin、JM2或IPEX。与大多数细胞表面标志物相比，它被认为是调节性T细胞的主调节基因和更特异的标志物。FOXP3在CD4+/CD25-细胞中的转导表达已被证明可诱导GITR、CD103和CTLA4，并赋予调节性T细胞表型。Biolegend抗体克隆206D和259D识别氨基酸105-235区域中的人FOXP3表位。Poly6238识别人和小鼠FOXP3，并针对FOXP3的N端部分。

[0221] 术语“调节”是指现有过程或行为的任何改变，如阻断(拮抗)和诱导(激动)。例如，G蛋白非依赖性信号传导的调节是指G蛋白非依赖性信号传导的任何显著改变。

[0222] 抗体、片段或缀合物的术语“内化”是指将抗体、片段和缀合物摄取到细胞中。优选地，确定具有内源性靶表达(例如本文别处所述的人或小鼠CCR8)的细胞系的内化。优选地，内化通过测量每个细胞的总内化荧光强度来确定，并相对于同种型对照进行量化，例如如实施例10.5所述。简而言之，用染料标记抗体、片段或偶联物和匹配的同种型对照，并且相对于同种型对照测定和定量抗体、片段或偶联物的内化荧光。“非内化抗体”定义为显示出与相应同种型对照基本相同的内化作用的抗体。“低内化抗体”定义为显示内化等于或低于同种型对照内化10倍，优选地低于同种型对照内化的9-、8-、7-、6-、5-、4-、3-、2-、1.5-、1.4-、1.3-、1.2-或1.1倍。“中等内化抗体”定义为显示等于或低于同种型对照内化的21倍并且高于同种型对照内化的10倍的内化的抗体。“高内化抗体”定义为高于同种型对照内化的21倍的内化的抗体。

[0223] 在替代方式中，内化还可以基于t(1/2)进行量化，即直到抗体、片段或缀合物的一半量被内化的时间。优选地，根据本发明的抗体的特征在于直到抗体、片段或缀合物的一半量被内化的时间，该时间为＞2小时，优选＞4、＞5、＞6、＞7、＞8、＞9、＞10、＞11、＞12、＞13、＞14、＞15、＞16、＞17、＞18、＞19、＞20、＞21、＞22、＞23、＞24、＞26、＞28、＞30或＞48小时。最优选地，根据本发明的抗体根本不被内化，即在抗体、片段或缀合物的一半量被内化之前不能定义时间。

[0224] “同种型对照”是一种抗体或片段，其不与靶标结合，但具有与识别靶标的参考抗体或片段相同的类别和类型。

[0225] 如果抗体或片段结合来自两种或多种不同物种的抗原，例如KD值为10-7M或更低，更优选地小于10-8M，甚至更优选地在10-9M至10-11M的范围内，则抗体或片段被称为“交叉反应”或“交叉反应性”。

[0226] 本文中所用的术语“特异性结合”是指识别特定抗原,但实质上不识别或结合样品中的其他分子的抗体:以实质性非特异性结合为特征的抗体将缺乏治疗适用性,因此这些实施方式被排除在外。然而,如本领域已知的,抗体或结合物的特异性结合不一定排除抗体或结合物与其他抗原/靶分子的结合。特异性结合来自一个物种的抗原的抗体也可以结合来自一个或多个其他物种的抗原。这种跨物种反应性本身不会改变抗体的特异性分类。

[0227] 在某些情况下,术语“特异性结合”或“特异性地结合”可用于指抗体、蛋白质或肽与第二种化学物质的相互作用,意味着相互作用取决于化学物质上特定结构(例如抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别并结合特定的蛋白质结构,而不是一般地结合蛋白质。如果抗体对表位“A”具有特异性,则在含有表位“A”和抗体的反应中,含有表位A的分子(或游离的、未标记的A)的存在将减少与抗体结合的标记A的量。

[0228] 在有疑问的情况下,抗体或结合物的特异性结合优选描述抗体、抗体片段或结合物以至少10-7M的亲和力(作为KD值;即优选KD值小于10-7M)与其抗原/靶标的结合,其中所述抗体或结合物对非特异性抗原具有至少两倍更低的亲和力,所述非特异性抗原不是预定的抗原/靶标分子或密切相关的抗原/靶标分子。

[0229] “多特异性”,也称为“多反应性”或“非特异性结合”,是指结合物或抗体结合一组确定的无关抗原的能力。如果抗体的(治疗)适用性受到损害,非特异性结合是实质性的。非蛋白质结构的多特异性,包括但不限于靶阴性细胞系或组织、杆状病毒颗粒(BVP)、胰岛素或DNA,可以如本领域已知的和本文所述进行评估。例如,可以例如通过使用模拟转染的CHO或HEK细胞的FACS分析来确定与靶阴性人细胞系的非特异性结合。在第二个实施例中,可以通过FACS分析衍生自相应组织的细胞系或细胞系组来分析与不同组织的非特异性结合。在第三个例子中,免疫细胞群体的非特异性结合可以在本领域已知的免疫细胞群体分类后通过FACS进行分析。在第四个例子中可以使用ELISA分析BVP、胰岛素或DNA的非特异性性结合,如Hötzel 、IsidroHötzel,Isidro,et al.″A strategy for risk mitigation of antibodies with fast clearance.″MAbs.Vol.4.No.6.Taylor&Francis,2012.;Avery,Lindsay B.,et al.″Establishing in vitro in vivo correlations to screen monoclonal antibodies for physicochemical properties related to favorable human pharmacokinetics.″MAbs.Vol.10.No.2.Taylor&Francis,2018.,和Jain,Tushar,et al.″Biophysical properties of the clinical-stage antibody landscape.″Proceedings of the National Academy of Sciences 114.5(2017):944-949所述,其全部内容并入本文,特别是关于分析和量化非特异性结合所需的技术细节。没有实质上非特异性结合的抗体的特征优选地为非特异性结合低于参考抗体Gantenerumab(Roche)的非特异性结合并且最优选地低于参考抗体Remicade(Janssen Biotech)的非特性结合。

[0230] 术语“脱靶结合”是指抗体结合不同于预期靶标的单个蛋白的能力,例如靶标蛋白家族的蛋白。可使用本领域已知的商业测定(例如Retrogenix脱靶分析测定)来评估脱靶结合。简而言之,抗体是在含有单独表达数千种人膜蛋白和分泌蛋白的HEK293细胞的微阵列上测试的。抗体与潜在脱靶的结合必须使用过度表达潜在脱靶的细胞的FACS来确认。

[0231] 术语“亲和性”是本领域的术语,并描述了结合物、抗体或抗体片段与靶标之间的结合强度。抗体及其片段对靶标的“亲和力”可以使用本领域公知或本文所述的技术来确定,例如通过ELISA、等温滴定量热法(ITC)、表面等离子共振(SPR)、流式细胞术或荧光偏振

测定。优选地，亲和性以解离常数KD提供。

[0232] “解离常数”(KD)具有摩尔单位(M)，并对应于一半靶标蛋白处于平衡状态时的结合物/抗体浓度。解离常数越小，结合物或抗体与其靶标之间的亲和力越高。

[0233] 根据本发明，抗体优选具有至少10-7M(作为KD值)的靶标亲和力，更优选至少10-8M，甚至更优选在10-9M至10-11M的范围内。KD值可优选通过表面等离子体共振光谱法测定，例如本文别处所述。如果发现测定条件影响测定的KD，则应使用标准偏差最小的测定设置。

[0234] “半最大有效浓度”(EC50)是指在规定的培养时间后，诱导在基线和最大值之间的一半的应答的药物、抗体、片段、缀合物或分子的浓度。在抗体结合的情况下，EC50因此反映了最大结合的一半所需的抗体浓度。如果可以通过描述所应用药物、抗体、片段、缀合物或分子浓度与信号之间的关系的剂量-反应曲线的数学建模(例如，非线性回归)来确定拐点，则可以确定EC50。例如，如果剂量-反应曲线遵循S形曲线，则可以确定EC50。当反应是抑制时，EC50被称为半最大抑制浓度(IC50)。EC80可作必要的修改后确定。

[0235] 术语“抗体”(Ab)是指与抗原特异性结合或免疫反应的免疫球蛋白分子，例如但不限于人IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgM，IgD，IgE，IgA1，IgA2，小鼠IgG1，IgG2a，IgG2b，IgG2c，IgG3，IgA，IgD，IgE或IgM，大鼠IgG1，IgG2a，IgG2b，IgG2c，IgA，IgD，IgE或IgM，兔IgA1，IgA2，IgA3，IgE，IgG，IgM，山羊IgA，IgE，IgG1，IgG2，IgE，IgM或鸡IgY。抗体或抗体片段在轻链和重链可变结构域中包含互补决定区(CDR)，也称为高变区。可变结构域中高度保守的部分称为框架(FR)。如本领域所知，描绘抗体高变区的氨基酸位置/边界可以根据上下文和本领域已知的各种定义而变化。如本文所用，免疫球蛋白氨基酸残基的编号是根据Kabat等的免疫球蛋白核酸残基编号系统进行的。天然重链和轻链的可变结构域各包含四个FR区域。每个链中的三个CDR被FR区紧密地连接在一起，并且与来自另一条链的CDR一起，有助于抗体抗原结合位点的形成，参见Kabat，E.A.，et al.″Sequences of Proteins of Immunological Interest(Natl.Inst.Health，Bethesda，MD)，GPO Publ.″No165-462(1987)。本文使用的术语抗体也指抗体片段，除非另有明确说明。根据各自的上下文，术语抗体也可以指具有免疫球蛋白样功能的任何蛋白质结合分子。

[0236] 术语“CDR”是指抗体的互补决定区。如本领域已知的，互补决定区(CDR)是抗体和T细胞受体中可变链的一部分。一组CDR构成一个副表位。CDR对抗原特异性的多样性至关重要。有三个CDR(CDR1、CDR2和CDR3)，非连续地排列在抗原受体可变结构域的氨基酸序列上。由于抗原受体通常包含两个可变结构域(在两个不同的多肽链上，重链和轻链)，因此每个抗原受体通常有六个CDR可以共同与抗原接触。轻链的CDR是LCDR1、LCDR2和LCDR3。重链的CDR被称为HCDR1、HCDR2和HCDR3。HCDR3是最可变的互补决定区(参见，例如，Chothia，Cyrus，and Arthur M.Lesk.″Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins.″Journal of molecular biology 196.4(1987):901-917.;Kabat，E.A.，et al.″Sequences of proteins of immunological interest.Bethesda，MD:US Department of Health and Human Services.″Public Health Service，National Institutes of Health(1991):103-511)。

[0237] “恒定区”是指赋予效应子功能的抗体分子部分。重链恒定区可以选自五种同种型中的任何一种:alpha(α)，delta(δ)，epsilon(ε)，gamma(g)，or mu(μ)。

[0238] 本文中使用的术语“Fc结构域”、“Fc区域”或“Fc部分”是指包含至少一部分恒定区的抗体重链的C端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。例如，人IgG重链Fc区可以从Cys226或Pro230延伸到重链的羧基末端。

[0239] 根据本发明的抗体或结合片段可以被修饰以改变至少一种恒定区介导的生物效应功能。例如，在一些实施方式中，抗体可以被修饰以相对于未修饰的抗体减少或增强至少一种恒定区介导的生物效应功能，例如减少或改善与Fc受体(FcγR)的结合。FcγR结合可能会降低，例如，通过突变抗体的免疫球蛋白恒定区片段中用于Fcγ受体相互作用的特定区域，(参见，例如，Canfield，Stephen M.，and Sherie L.Morrison."The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region." The Journal of experimental medicine 173.6(1991):1483-1491;and Lund，John，et al."Human Fc gamma RI and Fc gamma RII interact with distinct but overlapping sites on human IgG."The Journal of Immunology 147.8(1991):2657-2662)。FcγR结合可能会增强，例如通过非岩藻糖基化(afucosylation)。减少FcγR结合也可能减少依赖于Fcγ受体相互作用的其他效应功能，如调理、吞噬和抗原依赖性细胞毒性(“ADCC”)。

[0240] 此外，解决Fc与FcRn的相互作用允许调节体内抗体的半衰期。通过例如引入突变H435A来消除相互作用导致极短的半衰期，因为抗体不再受到FcRn循环的溶酶体降解的保护。在根据所有方面的一些优选实施方式中，根据本发明的抗体包含突变H435A或以其他方式被工程化以减少半衰期。

[0241] 相反包含“YTE”突变(M252Y/S254T/T256E)和/或等同突变(如“LS”突变(M428L/N434S))的抗体已显示，通过从临床前物种和人类的内体中更有效地回收可显著延长半衰期(Dall'Acqua，William F.，et al."Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor:biological consequences."The Journal of Immunology 169.9(2002):5171-5180.;Zalevsky，Jonathan，et al."Enhanced antibody half-life improves in vivo activity."Nature biotechnology 28.2(2010):157-159)。在根据所有方面的一些优选实施方式中，根据本发明的抗体包含YTE突变(M252Y/S254T/T256E)和/或等同突变，例如LS(M428L/N434S)，或以其他方式被工程化用于改善半衰期。Haraya，Kenta，Tatsuhiko Tachibana，and Tomoyuki Igawa."Improvement of pharmacokinetic properties of therapeutic antibodies by antibody engineering."Drug metabolism and pharmacokinetics 34.1(2019):25-41.，and/or Lee，Chang-Han，et al."An engineered human Fc domain that behaves like a pH-toggle switch for ultra-long circulation persistence."Nature communications 10.1(2019):1-11可以找到延长半衰期的合适Fc工程化方法，均通过引用并入本文。

[0242] “非岩藻糖基化”抗体是经过工程化的抗体，使得抗体Fc区的寡糖不具有任何岩藻糖单元。抗体的糖基化可以改变其功能。例如，如果IgG的CH2结构域中N297处的糖基化被完全消除，那么与FcγRs的结合就会丢失。然而，N297处特定碳水化合物组成的调节可具有相反的效果并增强抗体的ADCC活性。简而言之，抗体对激活FcγRs的亲和力取决于N297 N-连接寡糖的组成。有32种可能的低聚糖组合可出现在该位置。天然存在的人IgG和由杂交瘤或其他常见表达系统产生的人IgG通常包含N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)和形成核心碳水化合

物的三个甘露糖残基。该核连接到两个额外的GlcNAc基团以形成双十分支。半乳糖在每个分支的添加以及唾液酸在这些半乳糖分子中的末端添加都可能发生。岩藻糖通常是核心GlcNAc的一部分。这种岩藻糖通过空间位阻阻碍抗体与FcγRIIIA的相互作用。因此，消除这种岩藻糖分子同时在该位点保持其他形式的糖基化增加了抗体与活化FcγRs的结合，增强其引发ADCC和/或ADCP的能力(Almagro,Juan C.,et al."Progress and challenges in the design and clinical development of antibodies for cancer therapy." Frontiers in immunology 8(2018):1751)。制备无岩藻糖抗体的方法包括在大鼠骨髓瘤YB2/0细胞中生长(ATCC CRL 1662)。YB2/0细胞表达低水平的其编码α-1,6-岩藻糖基转移酶(这是多肽岩藻糖化所必需的酶)的FUT8 mRNA。非岩藻糖基化抗体对于本发明是优选的。

[0243] "抗体依赖性细胞毒性"("ADCC")，也称为"抗体依赖性细胞介导的细胞毒性"，是一种细胞介导免疫防御机制，通过这种机制，免疫细胞主动裂解膜表面抗原已被特异性抗体结合的靶细胞。ADCC通过抗体或片段与FcγRIIIa的相互作用介导。在人类中，FcγRIII以两种不同的形式存在:FcγRIIIa(CD16a)和FcγRI IIb(CD16b)。虽然FcγRIIIa作为跨膜受体在单核细胞、中性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞上表达，但FcγRIIIb仅在中性粒细胞上表达。这些受体与IgG抗体的Fc部分结合，然后激活由人效应细胞介导的抗体依赖性细胞介导细胞毒性(ADCC)。

[0244] 文献中已经描述了用于确定人类受试者中ADCC诱导的不同测定系统，其适用于本文公开的主题的表征。例如，Yao Te Hsieh等人研究了不同的ADCC测定系统，即基于(i)来自人类供体的自然杀伤细胞(FcγRIIIA+初级NK)的测定，(ii)FcγRIIIA工程化NK-92细胞和(iii)FcβRIIIA/NFAT-RE/luc2工程化Jurkat T细胞(Hsieh,Yao-Te,et al."Characterization of FcγRIIIA effector cells used in in vitro ADCC bioassay: comparison of primary NK cells with engineered NK-92 and Jurkat T cells." Journal of Immunological Methods 441(2017):56-66，全部内容并入本文;特别是参考这些测定的方法描述)。简而言之，所有三种效应细胞系统都差异表达FcγRIIIA，并提供剂量依赖性ADCC途径活性，但只有原代NK细胞和工程化NK-92细胞能够诱导ADCC介导的细胞裂解。对于ADCC活性的功能评估，原代NK或NK-92(V-158)细胞因此更好地反映了生理上相关的ADCC作用机制。作为工程化细胞系，NK-92细胞可能比原代NK细胞表现得更具再现性，因此是确定人类受试者ADCC反应的优选测定系统，例如在怀疑的情况下。

[0245] 诱导ADCC的抗体或抗原结合片段是在NK效应细胞存在下可引发靶细胞大量裂解的抗体。优选地，ADCC诱导导致至少2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的靶细胞裂解。

[0246] "抗体依赖性细胞吞噬作用"("ADCP")是指抗体调理的靶细胞激活巨噬细胞表面的FcγRs以诱导吞噬作用，从而导致靶细胞内化和降解的机制。对于ADCP，与作为效应细胞的巨噬细胞的结合通常通过抗体FC部分与巨噬细胞表达的FCγRIIa(CD32a)的相互作用发生。

[0247] 诱导ADCP的抗体或抗原结合片段是一种可在巨噬细胞存在下引发靶细胞的大量吞噬作用的抗体。优选地，ADCP诱导导致至少2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的靶细胞的吞噬作用。

[0248] “补体依赖性细胞毒性”(“CDC”)是IgG和IgM抗体的效应功能。当它们与靶细胞(例如细菌或病毒感染的细胞)上的表面抗原结合时,经典补体途径通过将蛋白C1q与这些抗体结合而触发,从而形成膜攻击复合物(MAC)和靶细胞裂解。补体系统被人IgG1、IgG3和IgM抗体有效激活,被IgG2抗体弱激活,不被IgG4抗体激活。这是治疗性抗体(也是根据本发明的抗体的特定实施方式)可以实现抗肿瘤作用的一种作用机制。存在几种实验室方法来确定CDC的效力,并且在本领域中是已知的。

[0249] 诱导CDC的抗体或抗原结合片段是可引发大量膜攻击复合物形成和靶细胞裂解的抗体。优选地,CDC诱导导致至少2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的靶细胞裂解。

[0250] 包含Fc区的抗体可以或可以不包含促进Fc结构域的第一和第二亚基结合的修饰。

[0251] “促进Fc结构域的第一和第二亚基结合的修饰”是对肽骨架的操纵或Fc结构亚基的翻译后修饰,其减少或阻止包含Fc结构区亚基的多肽与相同多肽的结合以形成同二聚体。包含Fc区的抗体可以或可以不包含促进Fc结构域的第一和第二亚基结合的修饰。本文所用的修饰促进结合特别包括对期望结合的两个Fc结构域亚基中的每一个(即Fc结构的第一和第二亚基)进行的单独修饰,其中所述修饰彼此互补,以促进两个Fc结构域亚单位的结合。例如,修饰促进结合可以改变一个或两个Fc结构域亚基的结构或电荷,从而使它们的结合在空间上或静电上有利。因此,(异源)二聚发生在这可能是不相同的包含第一Fc结构域亚基的多肽和包含第二Fc结构亚基的肽之间,例如在融合到每个亚基的其他成分(例如抗原结合部分)不相同的意义上。在一些实施方式中,修饰促进结合包括Fc结构域中的氨基酸突变,特别是氨基酸取代。在一个特定的实施方式中,修饰促进结合在Fc结构域的两个亚基中的每一个中包括单独的氨基酸突变,特别是氨基酸置换。

[0252] 本文所用抗体的“片段”需要基本上保持全长抗体的所需亲和力。因此,抗人CCR8抗体的合适片段将保持与靶趋化因子受体结合的能力,例如与人CCR8受体结合。抗体片段包含全长抗体的一部分,通常是其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab’、F(ab’)2和Fv片段、单链抗体分子、双抗体和域抗体,见Holt,Lucy J.,et al.″Domain antibodies:proteins for therapy.″Trends in biotechnology 21.11(2003):484-490。

[0253] “Fab片段”包含轻链的恒定结构域和重链的第一个恒定结构域(CH2)。

[0254] “Fab’片段”与Fab片段的不同之处在于在重链CH2结构域的羧基末端添加了几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。

[0255] “F(ab′)片段”是通过F(ab’)2胃蛋白酶消化产物的铰链半胱氨酸处的二硫键断裂产生的。抗体片段的其他化学偶联是本领域普通技术人员已知的。Fab和F(ab′)2片段缺乏完整抗体的Fc片段,从动物的循环中更快地清除,并且可能具有比完整抗体更少的非特异性组织结合,参见例如Wahl,Richard L.,Charles W.Parker,and Gordon W.Philpott.″Improved radioimaging and tumor localization with monoclonal F(ab′)2.″Journal of nuclear medicine:official publication,Society of Nuclear Medicine 24.4(1983):316-325。

[0256] “Fv片段”是包含完整靶标识别和结合位点的抗体的最小片段。该区域由一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体以紧密、非共价结合(VH-VL二聚体)而组成。正是在这种构

型中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以限定VH-VL二聚体表面上的抗原结合位点。通常,六个CDR赋予抗体抗原结合特异性。然而,在一些情况下,即使是单个可变结构域(或Fv的一半,其仅包含三个靶特异性CDR)也可能具有识别和结合抗原的能力,尽管其亲和力低于整个结合位点。

[0257] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含单个多肽链中抗体的VH和VL结构域。通常,Fv多肽还包括VH和VL结构域之间的多肽接头,其使scFv能够形成抗原结合所需的结构。

[0258] “单域抗体”包含对靶标表现出足够亲和力的单个VH或VL域。在特定实施方式中,单域抗体是骆驼化抗体,参见例如Riechmann,Lutz,and Serge Muyldermans.″Single domain antibodies:comparison of camel V H and camelised human VH domains.″Journal of immunological methods 231.1-2(1999):25-38。

[0259] “双特异性抗体”是对相同或不同抗原上至少两个不同表位具有结合特异性的单克隆抗体。在本公开中,一种结合特异性可针对靶趋化因子受体如CCR8,另一种可针对任何其他抗原,例如但不限于细胞表面蛋白、受体、受体亚基、组织特异性抗原、病毒衍生蛋白、病毒编码的包膜蛋白、细菌衍生蛋白或细菌表面蛋白。根据本发明的双特异性抗体构建体还包括包含多个结合域/结合位点的多特异性抗体构建体,例如三特异性抗体构建体,其中所述构建体包含三个结合域。

[0260] “衍生抗体”通常通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、硫酸化、酰胺化、已知保护/阻断基团的衍生化、蛋白水解裂解、与细胞配体或其他蛋白质的连接进行修饰。许多化学修饰中的任何一种可以通过已知技术进行,包括但不限于特定的化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外,该衍生物可以含有一种或多种非天然氨基酸,例如,使用Wolfson,Wendy.″Amber codon flashing ambrx augments proteins with unnatural amino acids.″Chemistry&biology 13.10(2006):1011-1012。根据本发明的抗体可以衍生化,例如糖基化或硫酸化。

[0261] “单克隆抗体”是结合特定抗原的抗体的基本同质群体。单克隆免疫球蛋白可通过本领域技术人员熟知的方法获得(例如,参见Köhler,Georges,and Cesar Milstein.″Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.″nature 256.5517(1975):495-497.,和美国专利号4,376,110)。具有特异结合亲和力的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段可以从原核或真核生物中分离、富集或纯化。本领域技术人员已知的常规方法能够在原核和真核生物中产生免疫球蛋白或免疫球蛋白片段和具有免疫球蛋白样功能的蛋白质结合分子。根据本发明的抗体优选是单克隆的。

[0262] “人源化抗体”包含源自非人类物种(例如小鼠)的CDR区,这些CDR区与任何必要的框架反向突变一起植入人类序列衍生的V区。因此,在大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体)的受体的高变区的残基被具有所需特异性、亲和力和能力的来自非人物种(供体抗体)(例如小鼠、大鼠、或非人灵长类动物)的高变区域的残基取代。例如,参见美国专利号5,225,539;5,585,089;5,693,761;5,693,762;5,859,205,各自通过引用并入本文。在某些情况下,人免疫球蛋白的框架残基被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体可包含受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体性能(例如,获得期望的亲和力)。通常,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个,通常是两个可变结构域,其中所有或基本上所有高变区对应于非人免疫球蛋白的那些,并且所有或基本所有框

架区是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体任选地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。有关更多详细信息,请参见Jones,Peter T.,et al."Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse."Nature 321.6069(1986):522-525.;Riechmann,Lutz,et al."Reshaping human antibodies for therapy."Nature 332.6162(1988):323-327.;and Presta,Leonard G."Antibody engineering."Current Opinion in Structural Biology 2.4(1992):593-596,各自通过引用并入本文。

[0263] 完全人抗体(人抗体)包括人源CDR,即人来源CDR。优选地,根据本发明的全人抗体是与最接近的人VH种系基因(例如从推荐列表中提取并在IMGT/Domain gap align中分析的序列)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%序列同一性的抗体。

[0264] 如2017年前有效的INN物种子系统等常用命名系统所接受的,与基于IMGT数据库确定的最接近的人类种系参考相比,全人类抗体可能包含少量种系偏差(http://www.imgt.org,2019年11月29日)。例如,与最接近的人类种系参考相比,根据本发明的全人类抗体可在CDR中包含多达1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14或15种种系偏差。通过克隆技术结合细胞富集或永生化步骤,可以从人源B细胞中开发出完全人抗体。然而,临床上使用的大多数完全人抗体要么是从针对人IgG基因座转基因的免疫小鼠中分离的,要么是通过噬菌体展示从复杂的组合文库中分离的(Brüggemann,Marianne,et al."Human antibody production in transgenic animals."Archivum immunologiae et therapiae experimentalis 63.2(2015):101-108.;Carter,Paul J."Potent antibody therapeutics by design."Nature reviews immunology 6.5(2006):343-357.;Frenzel,André,Thomas Schirrmann,and Michael Hust."Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy."MAbs.Vol.8.No.7.Taylor&Francis,2016.;Nelson,Aaron L.,Eugen Dhimolea,and Janice M.Reichert."Development trends for human monoclonal antibody therapeutics."Nature reviews drug discovery 9.10(2010):767-774)。

[0265] 有几种技术可用于产生完全人抗体或产生包含人源CDR的抗体(参见WO2008112640)。剑桥抗体技术公司(CAT)和Dyax已经从从免疫的人分离的外周B细胞中获得了抗体cDNA序列,并设计了噬菌体展示库用于鉴定具有特定特异性的人可变区序列。简言之,抗体可变区序列与M13噬菌体的基因III或基因VIII结构融合。这些抗体可变区序列在携带相应序列的噬菌体末端以Fab或单链Fv(scFv)结构表达。通过使用不同水平的抗原结合条件(严格性)的多轮筛选过程,可以选择和分离表达对感兴趣抗原特异的Fab或scFv结构的噬菌体。然后可以使用标准测序程序来阐明所选噬菌体的抗体可变区cDNA序列。然后,这些序列可用于使用已建立的抗体工程技术重建具有所需同种型的完整抗体。根据该方法构建的抗体被认为是完全人类抗体(包括CDR)。为了提高所选抗体的免疫反应性(抗原结合亲和力和特异性),可以引入体外成熟过程,包括不同重链和轻链的组合结合、重链和重链的CDR3处的缺失/添加/突变(以模拟V-J和V-D-J重组),和随机突变(模拟体细胞超突变)。这种方法产生的“全人”抗体的一个实例是抗肿瘤坏死因子α抗体Humira(阿达木单抗)。

[0266] 术语“多核苷酸”是指重组或合成生产的聚合脱氧核糖核苷酸或其类似物，或修饰的多核苷酸。该术语包括双链和单链DNA或RNA。多核苷酸可以整合到例如小环、质粒、粘粒、小染色体或人工染色体中。多核苷酸可分离或整合在另一核酸分子中，例如在真核宿主细胞的表达载体或染色体中。

[0267] 本文中使用的术语“载体”是指能够传播与其连接的核酸分子的核酸分子。该术语还包括质粒(非病毒)和病毒载体。某些载体能够指导它们可操作连接的核酸或多核苷酸的表达。这种载体在本文中称为“表达载体”。可通过将编码至少一种感兴趣蛋白(POI)的多核苷酸序列插入合适的载体骨架来构建用于真核用途的表达载体。载体骨架可以包括必要的元件，以确保载体的维持，并且如果需要的话，在宿主内提供扩增。对于病毒载体，例如慢病毒或逆转录病毒载体，可能需要进一步的病毒特异性元件，例如结构元件或其他元件，这些元件在本领域中是众所周知的。这些元件可以例如以顺式(在同一质粒上)或反式(在单独的质粒上)提供。病毒载体可能需要辅助病毒或包装线进行大规模转染。载体可包含其他元件，例如增强子元件(例如，病毒、真核细胞)、内含子和用于在哺乳动物细胞中复制的质粒复制的病毒起源。根据本发明，表达载体通常具有驱动POI表达的启动子序列。POI和/或选择性标志物蛋白的表达可以是组成性的或调节性的(例如，通过添加或去除小分子诱导剂来诱导)。哺乳动物宿主细胞表达的优选调节序列包括指导哺乳动物细胞中POI高水平表达的病毒元件，例如源自巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子Ad-LP)或多瘤的调节元件、启动子和/或增强子。有关病毒调节元件及其序列的进一步描述，请参见例如U.S.5,168,062，U.S.4,510,245和U.S.4,968,615。

[0268] 本文中使用的术语“接头”或“间隔子”是指能够在两个部分之间实现直接拓扑连接的任何分子。部分尤其可以是多肽、蛋白质、抗体、抗体片段、细胞毒性部分、结合部分、用于检测的部分如荧光团、用于固定或回收的部分如珠或磁珠、反应部分或任何其他分子。这两个部分可以是相同类型或不同的。接头可能是缀合物的一部分，甚至可能有助于其功能。例如，对于包含多肽和生物素的缀合物，在生物素的羧基和肽的第一个大体积氨基酸之间存在约4Å(约5个原子)的间隔子允许生物素到达(strept)亲和素结合袋。各种接头在本领域中是已知的，并且可以基于要连接的部分来选择。接头长度通常在4个原子和200个以上原子之间。长度超过60个原子的接头通常包括具有平均长度的化合物群。

[0269] “多肽接头”可以通过酰胺连接或任何其他功能残基连接。多肽的接头可以连接多肽的N端或C端，或者可以通过反应性官能团或氨基酸侧链连接。多肽可以例如与生物素、蛋白质如人血清白蛋白(HSA)、载体蛋白如keyhole limpet hemocyanin(KLH)、卵清蛋白(OVA)或牛血清白蛋白(BSA)、荧光染料、短氨基酸序列如Flag标签、HA标签、Myc标签或His标签、反应性标签如马来酰亚胺、碘乙酰胺、烷基卤化物、3-巯基丙基或4-叠氮丁酸，或连接到各种其它合适的部分。合适的接头的非限制性实例，例如用于多肽的偶联，包括β-丙氨酸、4-氨基丁酸(GABA)、(2-氨基乙氧基)乙酸(AEA)、5-氨基戊酸(Ava)、6-氨基己酸(Ahx)、PEG2间隔子(8-氨基-3,6-二氧杂辛酸)、PEG3间隔子(12-氨基-4,7,10-三氧杂十二烷酸)、PEG4间隔子(15-氨基-4,8,10,13-四氧杂五-癸酸)，和Ttds(三恶十三烷琥珀酰胺酸)。在一些情况下，接头可衍生自反应性部分，例如马来酰亚胺、碘代乙酰胺、烷基卤化物、3-巯基丙基或4-叠氮丁酸。在一些情况下，接头可包括聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯、或聚乙二醇或聚丙二醇的共聚物。

[0270] “抗体接头”是指在不同抗体部分之间建立共价连接的接头，包括肽接头和非蛋白质聚合物，包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇、聚丙醇的共聚物。

[0271] “治疗”受试者的疾病或“治疗”患有疾病的受试者是指对受试者进行药物治疗，例如施用药物，以减少或防止疾病的至少一种症状恶化。

[0272] 术语“预防(prevent/preventing/prevention)”等指的是减少受试者患疾病、障碍或病症的概率，所述受试者没有疾病、障碍或者病症，但有患疾病、病症或病症的风险或易患疾病、紊乱或者病症。

[0273] 术语“有效量”或“治疗有效量”在本文中可互换使用，指的是足以达到特定生物学结果或调节或改善受试者症状或症状发作时间的量，通常为至少约10％；通常至少约20％，优选至少约30％，或更优选至少约50％。可以基于肿瘤负荷的变化来评估抗体在癌症治疗中的使用效果。肿瘤收缩(客观反应)和疾病进展的时间都是癌症临床试验的重要终点。标准化应答标准，即RECIST(实体瘤应答评估标准)于2000年发布。2009年发布了更新(RECIST 1.1)。RECIST标准通常用于以客观应答为主要研究终点的临床试验，以及评估稳定疾病、进行肿瘤进展或进展时间分析的试验，因为这些结果测量基于对解剖肿瘤负荷及其在试验过程中的变化的评估。特定受试者的有效剂量可能因治疗条件、受试者整体健康、施用方法、途径和剂量以及副作用严重程度等因素而异。当组合时，有效量与组分的组合成比例，并且效果不限于单独的组分。

[0274] 如果未另行定义，“完全缓解”(CR)定义为所有靶病变消失。任何病理性淋巴结(无论是目标淋巴结还是非目标淋巴结)必须在短轴上减少至＜10mm。对于“部分缓解”(PR)，必须达到目标病变直径之和的至少30％的减少，以基准总直径为参考。对于“进展性疾病”(PD)，以研究中最小的总和作为参考，目标病变直径总和至少增加20％(如果研究中最小，则包括基线总和)。除了相对增加20％外，总和还必须显示出至少5mm的绝对增加。在“稳定疾病”(SD)中，没有观察到足够的收缩以符合PR的要求，也没有观察到充分的增加以符合PD的要求，将研究期间的最小总和直径作为参考。

[0275] 可用于确定本文所述的本发明抗体的治疗益处的次要结果测量包括以下内容：“客观缓解率”(ORR)定义为实现完全缓解(CR)或部分缓解(PR)的受试者比例。“无进展生存期”(PFS)定义为从抗体的第一次给药日期到疾病进展或死亡的时间，以先发生者为准。“总生存期”(OS)是指从疾病诊断之日或开始治疗之日起，被诊断患有该疾病的患者仍然活着的时间长度。“总体缓解持续时间”(DOR)定义为从参与者的初始CR或PR到疾病进展的时间。“缓解深度”(DpR)定义为与基线肿瘤负荷相比，在最大反应点观察到的肿瘤收缩百分比。ORR和PFS的临床终点可根据上述RECIST 1.1标准确定。

[0276] 在分析非人受试者的情况下，必须如本文其他地方所讨论的那样调整用于确定治疗效果和益处的上述参数，参见实施例12ff。

[0277] 根据本发明的典型“受试者”包括人类和非人类受试者。受试者可以是哺乳动物，如小鼠、大鼠、猫、狗、灵长类动物和/或人类。

[0278] 抗体、片段或缀合物的“药物组合物”(也称为“治疗制剂”)可通过将具有所需纯度的抗体与可选的生理学可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来制备，例如根据Remington′s Pharmaceutical Sciences(18th ed.;Mack Pub.Co.:Eaton,Pa.,1990)，例如以冻干制剂

或水溶液的形式。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对受体无毒，包括缓冲液，如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和蛋氨酸；防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵；六甲基氯化铵；苯扎氯铵、苯扎氯胺；苯酚、丁醇或苄醇；对羟基苯甲酸酯烷基酯，如对羟基苯磺酸甲酯或丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；间甲酚)；低分子量(少于约10个残基)多肽；蛋白质，如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂如EDTA；糖如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；形成盐的抗衡离子如钠；金属络合物(例如Zn蛋白络合物)；和/或非离子表面活性剂如Tween®、 Pluronic®或聚乙二醇(PEG)。

[0279] “宿主细胞”是用来接收、维持、繁殖和扩增载体的细胞。宿主细胞也可用于表达多肽，例如由载体编码的抗体或其片段。当宿主细胞分裂时，载体中包含的核酸被复制，从而扩增核酸。优选的宿主细胞是哺乳动物细胞，例如CHO细胞或HEK细胞。进一步优选的宿主细胞是大鼠骨髓瘤YB2/0细胞。

[0280] “具有内源性靶表达的细胞”是指在与生理或疾病情况相当的水平上表达靶蛋白的细胞。通常，经过过表达工程化改造的细胞表达的靶蛋白水平要高得多。

[0281] 在细胞、结构、蛋白质、抗体或标志物的上下文中，术语“瘤内”、“瘤内的”、“肿瘤浸润的”或“肿瘤的”是指它们在肿瘤组织中的定位。

[0282] 对某种标志物或蛋白质“阳性”或“+”的细胞是以该标志物或蛋白的大量表达为特征的细胞。标志物或蛋白质表达可以如本领域已知的那样测定和定量，例如定义不同的细胞群体。对于(免疫)细胞群的表征，标志物表达可以通过FACS或使用本文所述的任何其他技术来确定。

[0283] “白细胞”是表达CD45的免疫细胞。本文所用的“CD45+细胞”是指所有白细胞。CD45可作为区分免疫细胞和非免疫细胞的标志物。

[0284] 术语“淋巴细胞”是指所有未成熟、成熟、未分化和分化的白淋巴细胞群体，包括组织特异性和特殊性品种。作为非限制性实例，它包括B细胞、T细胞、NKT细胞和NK细胞。在一些实施方式中，淋巴细胞包括所有B细胞谱系，包括前B细胞、祖B细胞、早期前-B细胞、晚期前-B细胞，大前-B细胞和小前-B细胞以及未成熟B细胞、成熟B细胞、血浆B细胞、记忆B细胞、B-1细胞、B-2细胞和无能AN1/T3细胞群。

[0285] “T细胞”是表达TCRαβ、CD3和CD8或CD4的免疫细胞。如本文所用，该术语包括幼稚T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞，调节性T细胞、记忆T细胞、激活的T细胞、无能T细胞、耐受T细胞、嵌合B细胞和抗原特异性T细胞以及本领域已知的其他T细胞群体，细胞表面上T细胞受体(TCR)的存在将T细胞与其他淋巴细胞区分开来。

[0286] “CD8+T细胞”(也称为“细胞毒性T细胞”、“TC”、“细胞毒性T淋巴细胞”、“CTL”、“T杀伤细胞”、“细胞溶解性T细胞”、”CD8+T淋巴细胞“或”杀伤性T细胞”)是表达CD3、CD45和CD8的T细胞。CD8+T可以杀死癌细胞、被感染的细胞(特别是被病毒感染的细胞)或其他受损细胞。

[0287] “CD4+T细胞”(也称为“辅助性T细胞”、“Th细胞”)是表达CD3、CD4和CD45的免疫细胞。辅助性T细胞有几个亚群，例如但不限于Th1、Th2和Th17。CD4+T淋巴细胞有助于抑制或调节免疫反应。它们在B细胞抗体类别转换、细胞毒性T细胞的激活和生长以及最大化吞噬

细胞(如巨噬细胞)的杀菌活性中至关重要。

[0288] 如本文所用,术语“Treg细胞”(也称为“Tregs”、“调节性T细胞”、“T调节性细胞”、“抑制性T细胞”)是指表达CD3、CD4、CD45和FoxP3的免疫细胞,此外还表达高水平的CD25和低水平的CD127。Treg细胞的鉴定可如本文其他地方所述进行。Treg细胞通常也表达高水平的CTLA-4、GITR和LAG-3。在文献中,Treg还根据记忆标志物CD45RO进行了分类。

[0289] 在生理条件下,Treg细胞保持免疫耐受。在免疫应答过程中,Treg细胞停止T细胞介导的免疫,并抑制胸腺内逃脱阴性选择的自身反应性T细胞。Treg细胞还可以抑制其他类型的免疫细胞,如NK细胞和B细胞。适应性Treg细胞(称为Th3或Tr1细胞)被认为是在免疫应答期间产生的。

[0290] Treg细胞还通过抑制抗肿瘤免疫在免疫逃逸中发挥重要作用,从而提供免疫耐受环境。识别癌细胞的T细胞通常在肿瘤中大量存在,但其细胞毒性功能被附近的免疫抑制细胞抑制。Tregs在许多不同的癌症中都很丰富,在肿瘤微环境中高度富集,并因其在肿瘤进展中的作用而广为人知。

[0291] “激活的Treg细胞”表达CD4、CD45、FoxP3、CD69和CCR8,此外,CD25高表达,CD127低表达。CD69是T细胞激活标志物。

[0292] “CCR8阳性调节性T细胞”或“CCR8+调节性T淋巴细胞”是表达CCR8的Tregs。

[0293] “CD4conv细胞”是传统的CD4+、CD25-T细胞。

[0294] “γδT细胞”是在其表面表达独特的T细胞受体TCRγδ的T细胞。γδT细胞也表达CD3。

[0295] “B细胞”是表达CD19的免疫细胞,成熟的B细胞表达CD20和CD22。通过CD40激活后,B细胞发生分化,发生体细胞超突变和增强的免疫球蛋白类转换,形成成熟的B淋巴细胞或浆细胞(能够分泌Abs)。B细胞参与适应性免疫系统的体液免疫,是抗原呈递细胞。

[0296] “巨噬细胞”是表达低CD14、高CD16、CD11b、CD68、CD163和CD206的免疫细胞。巨噬细胞通过吞噬作用吞噬和消化细胞碎片、外来物质、微生物或癌细胞。除了吞噬作用,巨噬细胞在先天免疫中起着关键作用,并通过招募其他免疫细胞来帮助启动适应性免疫。例如,巨噬细胞作为T细胞的抗原呈递者很重要。促进炎症的巨噬细胞被称为M1巨噬细胞,而减少炎症并促进组织修复的巨噬细胞则被称为M2巨噬细胞。

[0297] 如本文所用,“MI巨噬细胞”是表达ACOD1的巨噬细胞的子集。M1巨噬细胞具有促炎、杀菌和吞噬功能。

[0298] 如本文所用,“M2巨噬细胞”是表达MRC1(CD206)的巨噬细胞的子集。M2巨噬细胞分泌抗炎性白细胞介素,在伤口愈合中发挥作用,是血运重建和上皮细胞再分化所需的。肿瘤相关巨噬细胞主要具有M2表型,似乎积极促进肿瘤生长。

[0299] “树突状细胞”(DC)是骨髓来源的白细胞,是最有效的抗原呈递细胞。树突状细胞专门用于捕获和处理抗原,将蛋白质转化为T细胞识别的主要组织相容性复合体(MHC)分子上的肽。如本文所定义,DC的特征在于CD1c、CD14、CD16、CD141、CD11c和CD123的表达。存在不同的树突状细胞亚群。在人类中,DC1是免疫原性的,而DC2细胞是耐受性的。成熟DC表达CD83,而浆细胞样DC表达CD123。

[0300] “NK细胞”(也是自然杀伤细胞)是表达CD45、CD16、CD56、NKG2D但CD3阴性的免疫细胞。NK细胞不需要激活来杀死缺失MHC 1类“自身”标志物的细胞。NCR1(也称为CD335或

NKp46)在NK细胞和NKT细胞的子集上表达。

[0301] “自然杀伤T(NKT)细胞”是一组具有T细胞和自然杀伤细胞特性的异质T细胞。

[0302] “iNKT细胞”(也称为“不变的自然杀伤T细胞”)表达不变的αβTCR(Vα24-Jα18,CD241o)、CD44hi、NK1.1(小鼠)和NKG2D。不变的TCR识别由非多态性MHC I类分子CD1d呈现的糖样蛋白抗原。这些细胞可以通过快速产生大量细胞因子(即IFNg)来影响免疫反应。

[0303] 如本领域所知,“效应细胞”是在刺激后主动支持免疫反应的免疫细胞。如本文所用,效应细胞是指表达Fcγ受体的免疫细胞,因此能够介导ADCC或ADCP。效应细胞的非限制性实例是单核细胞、中性粒细胞、肥大细胞,优选巨噬细胞和自然杀伤细胞。

[0304] “三级淋巴结构”是以LTta、LTtb、Cxcr5和Cxcl13表达增加为特征的肿瘤内结构。

[0305] 本文中使用的术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指人工T细胞表面受体,其被设计为在免疫效应细胞上表达并特异性结合抗原。CARs可作为过继细胞转移的治疗方法。从患者(血液、肿瘤或腹水)中取出单核细胞并进行修饰,使其表达特定形式抗原的受体。在一些实施方式中,CAR已经以对肿瘤相关抗原的特异性表达。CAR还可包含细胞内激活域、跨膜域和包含肿瘤相关抗原结合区的细胞外域。在一些方面,CAR包括单链可变片段(scFv)融合至CD3ζ跨膜和细胞内结构域。CAR设计的特异性可源自受体(例如肽)的配体。在一些实施方式中,CAR可以通过重定向表达肿瘤相关抗原特异性CAR的单核细胞/巨噬细胞来靶向癌症。

[0306] 剂量方案如本领域已知的那样缩写,例如每天(QD)、每2天(Q2D)或每3天(Q3D)。

[0307] 实施方式

[0308] 结合趋化因子受体的抗原和抗体

[0309] 方面1-抗原

[0310] 根据第一方面,提供了一种分离的硫酸化多肽,其包含七次跨膜受体的富含酪氨酸的结构域(TRD)。富含酪氨酸的结构域是保守的N端结构域,其特征为七次跨膜受体,例如CXC和CC趋化因子受体,参见实施例1。如本文所用,术语TRD指的是CXC或CC趋化蛋白受体位于从N末端计数的第一个半胱氨酸的N端的氨基酸或蛋白质序列。除了酪氨酸,TRD通常包括带负电的氨基酸残基,如天冬氨酸。所有CC和CXC趋化因子受体的TRD列于实施例4表4.1中,适用于小鼠、猴子和人类。

[0311] 酪氨酸硫酸化是一种普遍存在的翻译后蛋白质修饰,发生在所有多细胞生物中。它由酪氨酸蛋白硫转移酶(TPSTs)1和2催化,这两种高尔基体驻留酶将硫酸盐从辅因子PAPS(3′-磷酸腺苷5′-磷酸硫酸盐)转移到蛋白质底物中的环境依赖性酪氨酸。目前,只有一小部分硫酸化蛋白质是已知的,对生物硫酸化机制和特定修饰位置的理解仍在进行中,参见实施例4。虽然翻译后修饰,如糖基化、磷酸化、酰化、腺嘌呤化、法尼酰化、泛素化和硫酸化在活系统的蛋白质中很常见,抗体产生通常基于未修饰的靶序列进行。

[0312] 本发明人开发了一种不寻常的抗体生成方法,并惊奇地发现,根据第一方面的合成硫酸化多肽可用于提高趋化因子受体本身的抗体生成成功率,以及具有治疗用途的优异功能性质的趋化因子抗体的成功率,如本文别处所讨论的。高度特异性趋化因子受体抗体的成功率增加尤其令人惊讶,因为设计用于作为翻译后修饰的硫酸化酪氨酸的序列独立检测的研究抗体很少。

[0313] 七次跨膜受体可以来自表达以TRD为特征的趋化因子受体的任何物种,例如人、猴子、猕猴(食蟹猴)、猕猴(恒河猴)、啮齿动物、小鼠、大鼠、马、牛、猪、狗、猫和骆驼。

[0314] 根据第一方面的一些第一实施方式，提供了一种分离的多肽，其中所述分离的多肽包含七次跨膜受体的富含酪氨酸的结构域(TRD)，其进一步的特征在于TRD的至少25％、至少50％或至少75％的TRD的酪氨酸残基被硫酸化。

[0315] 例如，在高度成功的抗体活动中，人或食蟹猴CCR8的TRD在位置Y3、Y15和Y17被硫酸化，而Y16被省略，即TRD中75％的酪氨酸被硫酸化(表6.1)。在另一个实例中，人CCR4的TRD在19和22位被硫酸化，并用于脱靶结合，即50％的酪氨酸被硫酸化(表8.1)。在另一种方法中，鼠CCR4的TRD在第22位被硫酸化并用于脱靶结合，即TRD中25％的酪氨酸被硫酸化(表6.1)。

[0316] 表4.1显示了硫酸化肽的列表，其包括酪氨酸硫酸化的优选位置。在不受理论束缚的情况下，本发明人认为，酪氨酸硫酸盐形式的额外电荷的引入使抗体能够识别特定的负电荷模式。这种识别似乎需要至少在抗体的HCDR3中增加酪氨酸和带正电荷氨基酸的百分比，即，根据本发明的分离的硫酸化多肽的使用也影响了抗体的结构组成，特别是HCDR3的氨基酸组成，参见实施例9。

[0317] 根据第一方面的一些第二实施方式，其可以与第一方面的第一实施方式相同或不同，提供了一种分离的多肽，其中所述七次跨膜受体是人、食蟹猴或小鼠。

[0318] 在这些第二实施方式中的一些中，七次跨膜受体是鼠的。在这些第二实施方式中的一些优选实施方式中，七次跨膜受体是人和/或食蟹猴。在这些第二实施方式中的一些优选实施方式中，七次跨膜受体是人的。在这些第二实施方式中的一些中，七次跨膜受体是食蟹猴。

[0319] 根据第一方面的一些第三实施方式，其可以与第一方面的第一和/或第二实施方式相同或不同，提供了一种分离的多肽，其中所述七次跨膜受体是趋化因子受体，优选地

[0320] a)CC趋化因子受体，例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9或CCR10，

[0321] b)CXC趋化因子受体，例如CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5或CXCR6，或

[0322] c)CX3CR1或CXCR1。

[0323] 在这些第三实施方式中的一些中，七次跨膜受体是CC趋化因子受体或CXC趋化因子受体。在这些第三实施方式中的一些实施方式中，七次跨膜受体是CC趋化因子受体，例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9或CCR10。在这些第三实施方式中的某些优选方式中，七次跨膜受体是CCR8或CCR4。在这些第三实施方式中的一些中，七次跨膜受体是CXC趋化因子受体，例如CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5或CXCR6。在这些第三实施方式中的一些中，七次跨膜受体是CX3CR1或CXCR1。

[0324] 在第一方面的一些优选实施方式中，提供了一种分离的多肽，其包含人或食蟹猴七次跨膜受体的TRD，其特征在于TRD的至少25％、至少50％或至少75％的TRD的酪氨酸残基被硫酸化，其中所述七次跨膜受体是是CC趋化因子受体或CXC趋化因子受体，并优选地，其中七次跨膜受体是CCR8或CCR4。

[0325] 根据第一方面的第三实施方式的一些实施方式A，分离的硫酸化多肽包含以下序列或与以下序列具有至少90％、95％或98％序列同一性的序列

[0326] a)SEQ ID NO:1(CCR1_HUMAN_TRD)，优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化，或

[0327] b)SEQ ID NO:7(CCR2_HUMAN_TRD)，优选地其中至少Y26已被硫酸化，或

[0328] c)SEQ ID NO:13(CCR3_HUMAN_TRD),优选地其中Y16和/或Y17已被硫酸化,或

[0329] d)SEQ ID NO:19(CCR4_HUMAN_TRD),优选地其中至少Y22已被硫酸化,并且优选地Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化;或

[0330] e)SEQ ID NO:25(CCR5_HUMAN_TRD),优选地其中Y3、Y10、Y14和Y15中的两个、三个或全部已被硫酸化,或

[0331] f)SEQ ID NO:31(CCR6_HUMAN_TRD),优选地其中Y18、Y26和Y27中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0332] g)SEQ ID NO:37(CCR7_HUMAN_TRD),优选地其中Y8和Y17中的一个或两个已被硫酸化,或

[0333] h)SEQ ID NO:43(CCR8_HUMAN_TRD),优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0334] i)SEQ ID NO:61(CCR9_HUMAN_TRD),其中至少Y28和优选地Y17和/或Y37已被硫酸化,或

[0335] j)SEQ ID NO:67(CCR10_HUMAN_TRD),优选地其中Y14和Y22中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0336] k)SEQ ID NO:73(CXCR1_HUMAN_TRD),优选地其中Y27已被硫酸化,或

[0337] l)SEQ ID NO:79(CXCR2_HUMAN_TRD),优选地其中Y23和/或Y25已被硫酸化,或

[0338] m)SEQ ID NO:85(CXCR3_HUMAN_TRD),优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0339] n)SEQ ID NO:91(CXCR4_HUMAN_TRD),优选地其中至少Y12和/或Y21已被硫酸化,或

[0340] o)SEQ ID NO:97(CXCR5_HUMAN_TRD),优选地其中Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化,或

[0341] p)SEQ ID NO:103(CXCR6_HUMAN_TRD),优选地其中Y6和Y10中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0342] q)SEQ ID NO:157(CX3CR1_HUMAN_TRD),优选地其中至少Y14已被硫酸化,或

[0343] r)SEQ ID NO:163(CXCR1_HUMAN_TRD),优选地其中至少Y27已被硫酸化。

[0344] 根据第一方面的第三实施方式的一些实施方式B,分离的硫酸化多肽包含以下序列或与以下序列具有至少90%、95%或98%序列同一性的序列

[0345] a)SEQ ID NO:3(CCR1_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,或

[0346] b)SEQ ID NO:9(CCR2_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y37和/或Y39已被硫酸化,或

[0347] c)SEQ ID NO:15(CCR3_MOUSE_TRD),优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化,或

[0348] d)SEQ ID NO:21(CCR4_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y22已被硫酸化,并且优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化;或

[0349] e)SEQ ID NO:27(CCR5_MOUSE_TRD),优选地其中Y10、Y12和Y16中的两个或三个已被硫酸化,或

[0350] f)SEQ ID NO:33(CCR6_MOUSE_TRD),优选地其中Y13、Y18和Y19中的两个或三个已被硫酸化,或

[0351] g)SEQ ID NO:39(CCR7_MOUSE_TRD),优选地其中Y8和Y17中的一个或两个以及任

选地Y20已被硫酸化,或

[0352] h)SEQ ID NO:45(CCR8_MOUSE_TRD),优选地其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0353] i)SEQ ID NO:63(CCR9_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y28已被硫酸化,且优选地Y19也已被硫酸化;或

[0354] j)SEQ ID NO:69(CCR10_MOUSE_TRD),优选地其中Y14、Y17和Y22中的至少一个、两个或全部已被硫酸化,或

[0355] k)SEQ ID NO:75(CXCR1_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y6已被硫酸化,或

[0356] 1)SEQ ID NO:81(CXCR2_MOUSE_TRD),优选地其中Y24已被硫酸化,或

[0357] m)SEQ ID NO:87(CXCR3_MOUSE_TRD),优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0358] n)SEQ ID NO:93(CXCR4_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y23、Y13和/或Y14已被硫酸化,或

[0359] o)SEQ ID NO:99(CXCR5_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y3和/或Y14和/或Y20和/或Y26已被硫酸化,或

[0360] p)SEQ ID NO:105(CXCR6_MOUSE_TRD),优选地其中Y11和Y15中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0361] q)SEQ ID NO:159(CX3CR1_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y15已被硫酸化,或

[0362] r)SEQ ID NO:165(CXCR1_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y6已被硫酸化。

[0363] 根据第一方面的第三实施方式的一些实施方式C,分离的硫酸化多肽包含以下序列或与以下序列具有至少90%、95%或98%序列同一性的序列

[0364] a)SEQ ID NO:2(CCR1_MACFA_TRD),优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,或

[0365] b)SEQ ID NO:8(CCR2_MACMU_TRD),优选地其中至少Y26已被硫酸化,或

[0366] c)SEQ ID NO:14(CCR3_MACFA_TRD),优选地其中Y16已被硫酸化,或

[0367] d)SEQ ID NO:20(CCR4_MACFA_TRD),优选地其中至少Y22已被硫酸化,并且优选地Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化,或

[0368] e)SEQ ID NO:26(CCR5_MACMU_TRD),优选地其中Y3、Y10、Y14和Y15中的两个、三个或全部已被硫酸化,或

[0369] f)SEQ ID NO:32(CCR6_MACFA_TRD),优选地其中Y23、Y31和Y32中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0370] g)SEQ ID NO:38(CCR7_MACFA_TRD),优选地其中Y8和Y17中的一个或两个已被硫酸化,或

[0371] h)SEQ ID NO:44(CCR8_MACFA_TRD),优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0372] i)SEQ ID NO:62(CCR9_MACFA_TRD),优选地其中至少Y28,优选地Y17和/或Y37也已被硫酸化,或

[0373] j)SEQ ID NO:68(CCR10_MACFA_TRD),优选地其中Y14和Y22中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0374] k)SEQ ID NO:74(CXCR1_MACFA_TRD),优选地其中Y14和Y28中的至少一个已被硫

酸化,或

[0375] l)SEQ ID NO:80(CXCR2_MACFA_TRD),优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化,或

[0376] m)SEQ ID NO:86(CXCR3_MACFA_TRD),优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0377] n)SEQ ID NO:92(CXCR4_MACFA_TRD),优选地其中至少Y12和/或Y21已被硫酸化,或

[0378] o)SEQ ID NO:98(CXCR5_MACFA_TRD),优选地其中Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化,或

[0379] p)SEQ ID NO:104(CXCR6_MACFA_TRD),优选地其中Y4、Y7和Y39中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0380] q)SEQ ID NO:158(CX3CR1_MACFA_TRD),优选地其中至少Y20已被硫酸化,或

[0381] r)SEQ ID NO:164(CXCR1_MACMU_TRD),优选地其中至少Y14已被硫酸化。

[0382] 在第一方面的一些第四实施方式中,其可以与根据第一方面的第一、第二和/或第三实施方式相同或不同,分离的多肽包含含有TRD和LID结构域的七次跨膜受体的N端,优选地,其中至少TRD和LID结构域之间的半胱氨酸已被去除或已被改变为不同的氨基酸。

[0383] 趋化因子受体的细胞外结构域可分为四个区域:

[0384] (i)N端结构域,可细分为

[0385] (a)膜远端富含酪氨酸的结构域(TRD),

[0386] (b)半胱氨酸,以及

[0387] (c)LID结构域,

[0388] (iii)细胞外结构域1(ECL1),

[0389] (iii)细胞外结构域2(ECL2),和

[0390] (iv)胞外结构域3(ECL3)。

[0391] 根据本发明的一些多肽难以处理,例如由于高聚集倾向。在不受理论束缚的情况下,发明人认为,高“粘性”是由于带电氨基酸和带电硫酸盐残基数量增加所致。对于包含趋化因子受体N端的多肽,可以通过去除TRD和LID结构域之间的半胱氨酸或氨基酸交换来改善聚集特性。通过将半胱氨酸改变为丝氨酸获得最佳结果(实施例5,表4.1)。

[0392] 在根据第一方面的一些第四实施方式中,可以省略半胱氨酸,并且TRD和LID直接连接。在根据第一方面的一些不同的第四实施方式中,半胱氨酸可以被不同的极性不带电氨基酸取代。在根据第一方面的一些优选的第四实施方式中,半胱氨酸被丝氨酸取代(参见表4.1)。在根据第一方面的一些第四实施方式中,半胱氨酸可以被至少一种不同的氨基酸取代。

[0393] 根据第一方面的第四实施方式的一些实施方式A,分离的硫酸化多肽包含以下序列或与以下序列具有至少90%、95%或98%序列同一性的序列

[0394] a)SEQ ID NO:4(CCR1_HUMAN_N term),其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,

[0395] b)SEQ ID NO:10(CCR2_HUMAN_N term),其中至少Y26已被硫酸化,

[0396] c)SEQ ID NO:16(CCR3_HUMAN_N term),其中Y16和/或Y17已被硫酸化,

[0397] d)SEQ ID NO:22(CCR4_HUMAN_N term),其中至少Y22已被硫酸化并且优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化,

[0398] e)SEQ ID NO:28(CCR5_HUMAN_N term),其中Y3、Y10、Y14和Y15中的两个、三个或全部已被硫酸化,

[0399] f)SEQ ID NO:34(CCR6_HUMAN_N term),其中Y18、Y26和Y27中的至少两个或三个已被硫酸化,

[0400] g)SEQ ID NO:40(CCR7_HUMAN_N term),其中Y8和Y17中的一个或两个已被硫酸化,

[0401] h)SEQ ID NO:46(CCR8_HUMAN_N term),其中Y3、Y15和Y17的至少两个或全部已被硫酸化,

[0402] i)SEQ ID NO:64(CCR9_HUMAN_N term),其中至少Y28,并且优选地Y17和/或Y37已被硫酸化,

[0403] j)SEQ ID NO:70(CCR10_HUMAN_N term),其中Y14和Y22中的至少一个或两个已被硫酸化,

[0404] k)SEQ ID NO:76(CXCR1_HUMAN_N term),其中Y27已被硫酸化,

[0405] l)SEQ ID NO:82(CXCR2_HUMAN_N term),其中Y23和/或Y25已被硫酸化,

[0406] m)SEQ ID NO:88(CXCR3_HUMAN_N term),其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,

[0407] n)SEQ ID NO:94(CXCR4_HUMAN_N term),其中至少Y12和/或Y21已被硫酸化,

[0408] o)SEQ ID NO:100(CXCR5_HUMAN_N term),其中Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化,或

[0409] p)SEQ ID NO:106(CXCR6_HUMAN_N term),其中Y6和Y10中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0410] q)SEQ ID NO:160(CX3CR1_HUMAN_N term),优选地其中至少Y14已被硫酸化,或

[0411] r)SEQ ID NO:166(CXCR1_HUMAN_N term),优选地其中至少Y27已被硫酸化。

[0412] 根据第一方面的第四实施方式的一些实施方式B,分离的硫酸化多肽包含以下序列或与以下序列具有至少90%、95%或98%序列同一性的序列

[0413] a)SEQ ID NO:6(CCR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,或

[0414] b)SEQ ID NO:12(CCR2_MOUSE_N term),优选地其中至少Y37和/或Y39已被硫酸化,或

[0415] c)SEQ ID NO:18(CCR3_MOUSE_N term),优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化,或

[0416] d)SEQ ID NO:24(CCR4_MOUSE_N term),优选地其中至少Y22已被硫酸化并且优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化,或

[0417] e)SEQ ID NO:30(CCR5_MOUSE_N term),优选地其中Y10、Y12和Y16中的两个或三个已被硫酸化,或

[0418] f)SEQ ID NO:36(CCR6_MOUSE_N term),优选地其中Y13、Y18和Y19中的至少两个或三个已被硫酸化,

[0419] g)SEQ ID NO:42(CCR7_MOUSE_N term),优选地其中Y8和Y17中的一个或两个以及任选的Y20已被硫酸化,或

[0420] h)SEQ ID NO:48(CCR8_MOUSE_N term,C＝X或S),优选地其中Y3、Y14和Y15中的至

少两个或全部已被硫酸化,或

[0421] i)SEQ ID NO:66(CCR9_MOUSE_N term),优选地其中至少Y28已被硫酸化,并且优选地Y19也已被硫酸化,或

[0422] j)SEQ ID NO:72(CCR10_MOUSE_N term),优选地其中Y14、Y17和Y22中的至少一个、两个或全部已被硫酸化,或

[0423] k)SEQ ID NO:78(CXCR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y6已被硫酸化,或

[0424] l)SEQ ID NO:84(CXCR2_MOUSE_N term),优选地其中Y24已被硫酸化,或

[0425] m)SEQ ID NO:90(CXCR3_MOUSE_N term),优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0426] n)SEQ ID NO:96(CXCR4_MOUSE_N term),优选地其中至少Y23和/或Y14已被硫酸化,或

[0427] o)SEQ ID NO:102(CXCR5_MOUSE_N term),优选地其中至少Y3和/或Y14和/或Y20和/或Y26已被硫酸化,或

[0428] p)SEQ ID NO:108(CXCR6_MOUSE_N term),优选地其中Y11和Y15中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0429] q)SEQ ID NO:162(CX3CR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y15已被硫酸化,或

[0430] r)SEQ ID NO:168(CXCR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y6已被硫酸化。

[0431] 根据第一方面的第四实施方式的一些实施方式C,分离的硫酸化多肽包含以下序列或与以下序列具有至少90%、95%或98%序列同一性的序列

[0432] a)SEQ ID NO:5(CCR1_MACFA_N term),优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,或

[0433] b)SEQ ID NO:11(CCR2_MACMU_N term),优选地其中至少Y26已被硫酸化,或

[0434] c)SEQ ID NO:17(CCR3_MACFA_N term),优选地其中Y16已被硫酸化,或

[0435] d)SEQ ID NO:23(CCR4_MACFA_N term),优选地其中至少Y22已被硫酸化并且优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化,或

[0436] e)SEQ ID NO:29(CCR5_MACMU_N term),优选地其中Y3、Y1 0、Y14和Y15中的两个、三个或全部已被硫酸化,或

[0437] f)SEQ ID NO:35(CCR6_MACFA_N term),优选地其中Y23、Y31和Y32中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0438] g)SEQ ID NO:41(CCR7_MACFA_N term),优选地其中Y8和Y17中地一个或两个已被硫酸化,或

[0439] h)SEQ ID NO:47(CCR8_MACFA_N term),优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0440] i)SEQ ID NO:65(CCR9_MACFA_N term),优选地其中至少Y28,并且优选地Y17和/或Y37已被硫酸化,或

[0441] j)SEQ ID NO:71(CCR10_MACFA_N term),优选地其中Y14和Y22中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0442] k)SEQ ID NO:77(CXCR1_MACFA_N term),优选地其中Y14和Y28中的至少一个已被硫酸化,或

[0443] l)SEQ ID NO:83(CXCR2_MACFA_N term),优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化,或

[0444] m)SEQ ID NO:89(CXCR3_MACFA_N term),优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0445] n)SEQ ID NO:95(CXCR4_MACFA_N term),优选地其中至少Y12和/或Y21已被硫酸化,或

[0446] o)SEQ ID NO:101(CXCR5_MACFA_N term),优选地其中Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化,或

[0447] p)SEQ ID NO:107(CXCR6_MACFA_N term),优选地其中Y4、Y7和Y39中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0448] q)SEQ ID NO:161(CX3CR1_MACFA_N term),优选地其中至少Y20或Y22已被硫酸化,或

[0449] r)SEQ ID NO:167(CXCR1_MACMU_N term),优选地其中至少Y14或Y28已被硫酸化。

[0450] 在第一方面的一些第四实施方式中,分离的硫酸化多肽包含以下序列

[0451] a)SEQ ID NO:4(CCR1_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:5(CCR1_MACFA_N term,或SEQ ID NO:6(CCD1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,或

[0452] b)SEQ ID NO:10(CCR2_HUMAN_N term)或SEQ ID NO:11(CCR2_MACMU_N term),优选地其中至少Y26已被硫酸化,或

[0453] c)SEQ ID NO:12(CCR2_MOUSE_N term),优选地其中至少Y37和/或Y39已被硫酸化,或

[0454] d)SEQ ID NO:16(CCR3_HUMAN_N term),优选地其中Y16和/或Y17已被硫酸化,或

[0455] e)SEQ ID NO:17(CCR3_MACFA_N term),优选地其中Y16已被硫酸化,或

[0456] f)SEQ ID NO:18(CCR3_MOUSE_N term),优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化,或

[0457] g)SEQ ID NO:22(CCR4_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:23(CCR4_MACFA_N term,或SEQ ID NO:24(CCR4_MOUSE_N term),优选地至少其中Y22已被硫酸化并且优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化,或

[0458] h)SEQ ID NO:28(CCR5_HUMAN_N term)或SEQ ID NO:29(CCR5_MACMU_N term),优选地其中Y3、Y10、Y14和Y15中的两个、三个或全部已被硫酸化,或

[0459] i)SEQ ID NO:30(CCR5_MOUSE_N term),优选地其中Y10、Y12和Y16中的两个或三个已被硫酸化,或

[0460] j)SEQ ID NO:34(CCR6_HUMAN_N term),优选地其中Y18、Y26和Y27中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0461] k)SEQ ID NO:35(CCR6_MACFA_N term),优选地其中Y23、Y31和Y32中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0462] l)SEQ ID NO:36(CCR6_MOUSE_N term),优选地其中Y13、Y18和Y19中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0463] m)SEQ ID NO:40(CCR7_HUMAN_N term)或SEQ ID NO:41(CCR7_MACFA_N term),优选地其中Y8和Y17中的一个或两个已被硫酸化,或

[0464] n)SEQ ID NO:42(CCR7_MOUSE_N term),优选地其中Y8和Y17中的一个或两个以及任选的Y20已被硫酸化,或

[0465] o)SEQ ID NO:46(CCR8_HUMAN_N term,C＝X或S),或SEQ ID NO:47(CCR8_MACFA_N term,C＝X或S),优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0466] p)SEQ ID NO:48(CCR8_MOUSE_N term,C＝X或S),优选地其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0467] q)SEQ ID NO:64(CCR9_HUMAN_N term)或SEQ ID NO:65(CCR9_MACFA_N term),优选地至少Y28,并且还优选地Y17和/或Y37已被硫酸化,或

[0468] r)SEQ ID NO:66(CCR9_MOUSE_N term),优选地其中至少Y28已硫酸化,并且还优选地Y19已被硫酸化;或

[0469] s)SEQ ID NO:70(CCR10_HUMAN_N term),或SEQ ID NO:71(CCR10_MACFA_N term),优选地其中Y14和Y22中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0470] t)SEQ ID NO:72(CCR10_MOUSE_N term),优选地其中Y14、Y17和Y22中的至少一个、两个或全部已被硫酸化,或

[0471] u)SEQ ID NO:76(CXCR1_HUMAN_N term),优选地其中Y27已被硫酸化,或

[0472] v)SEQ ID NO:77(CXCR1_MACFA_N term),优选地其中Y14和Y28中的至少一个已被硫酸化,或

[0473] w)SEQ ID NO:78(CXCR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y6已被硫酸化,或

[0474] x)SEQ ID NO:82(CXCR2_HUMAN_N term),优选地其中Y23和/或Y25已被硫酸化,或

[0475] y)SEQ ID NO:83(CXCR2_MACFA_N term),优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化,或

[0476] z)SEQ ID NO:84(CXCR2_MOUSE_N term),优选地其中Y24已被硫酸化,或

[0477] aa)SEQ ID NO:88(CXCR3_HUMAN_N term),SEQ ID NO:89(CXCR3_MACFA_N term),或SEQ ID NO:90(CXCR3_MOUSE_N term),优选地Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0478] bb)SEQ ID NO:94(CXCR4_HUMAN_N term),或SEQ ID NO:95(CXCR4_MACFA_N term),优选地其中至少Y12和/或Y21已被硫酸化,或

[0479] cc)SEQ ID NO:96(CXCR4_MOUSE_N term),优选地其中至少Y23和/或Y14已被硫酸化,或

[0480] dd)SEQ ID NO:100(CXCR5_HUMAN_N term),或SEQ ID NO:101(CXCR5_MACFA_N term),优选地其中Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化,或

[0481] ee)SEQ ID NO:102(CXCR5_MOUSE_N term),优选地其中至少Y3和/或Y14和/或Y20和/或Y26已被硫酸化,或

[0482] ff)SEQ ID NO:106(CXCR6_HUMAN_N term),优选地其中Y6和Y10中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0483] gg)SEQ ID NO:107(CXCR6_MACFA_N term),优选地其中Y4、Y7和Y39中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0484] hh)SEQ ID NO:108(CXCR6_MOUSE_N term),优选地其中Y11和Y15中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0485] ii)SEQ ID NO:160(CX3CR1_HUMAN_N term),优选地其中至少Y14已被硫酸化,或

[0486] jj)SEQ ID NO:161(CX3CR1_MACFA_N term),优选地其中至少Y20或Y22已被硫酸化,或

[0487] kk)SEQ ID NO:162(CX3CR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y15已被硫酸化,或

[0488] ll)SEQ ID NO:166(CXCR1_HUMAN_N term),优选地其中至少Y27已被硫酸化,或

[0489] mm)SEQ ID NO:167(CXCR1_MACMU_N term),优选地其中至少Y14或Y28已被硫酸化,或

[0490] nn)SEQ ID NO:168(CXCR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y6已被硫酸化。

[0491] 在第一方面的一些第一、第二、第三或第四实施方式中,分离的硫酸化多肽包含以下序列或与以下序列具有至少90%序列同一性的序列

[0492] a)SEQ ID NO:1(CCR1_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:4(CCR1_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:2(CCR1_MACFA_TRD)、SEQ ID NO:5(CCR1_MACFA_N term)、SEQ ID NO:3(CCR1_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:6(CCR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,或

[0493] b)SEQ ID NO:7(CCR2_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:10(CCR2_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:8(CCR2_MACMU_TRD)或SEQ ID NO:11(CCR2_MACMU_N term),优选地其中至少Y26已被硫酸化,或

[0494] c)SEQ ID NO:9(CCR2_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:12(CCR2_MOUSE_N term),优选地其中至少Y37和/或Y39已被硫酸化,或

[0495] d)SEQ ID NO:13(CCR3_HUMAN_TRD)或SEQ ID NO:16(CCR3_HUMAN_N term),优选地其中Y16和/或Y17已被硫酸化,或

[0496] e)SEQ ID NO:14(CCR3_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:17(CCR3_MACFA_N term),优选地其中Y16已被硫酸化,或

[0497] f)SEQ ID NO:15(CCR3_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:18(CCR3_MOUSE_N term),优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化,或

[0498] g)SEQ ID NO:19(CCR4_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:22(CCR4_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:20(CCR4_MACFA_TRD)、SEQ ID NO:23(CCR4_MACFA_N term)、SEQ ID NO:21(CCR4_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:24(CCR4_MOUSE_N term),优选地其中至少Y22已被硫酸化并且优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化,或

[0499] h)SEQ ID NO:25(CCR5_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:28(CCR5_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:26(CCR5_MACMU_TRD)或SEQ ID NO:29(CCR5_MACMU_N term),优选地其中Y3、Y10、Y14和Y15的两个、三个或全部已被硫酸化,或

[0500] i)SEQ ID NO:27(CCR5_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:30(CCR5_MOUSE_N term),优选地其中Y10、Y12和Y16中的两个或三个已被硫酸化,或

[0501] j)SEQ ID NO:31(CCR6_HUMAN_TRD)或SEQ ID NO:34(CCR6_HUMAN_N term),优选地其中Y18、Y26和Y27中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0502] k)SEQ ID NO:32(CCR6_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:35(CCR6_MACFA_N term),优选地其中Y23、Y31和Y32中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0503] l)SEQ ID NO:33(CCR6_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:36(CCR6_MOUSE_N term),优选地其中Y13、Y18和Y19中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0504] m)SEQ ID NO:37(CCR7_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:40(CCR7_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:38(CCR7_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:41(CCR7_MACFA_N term),优选地Y8和Y17中的一个或两个被硫酸化,或

[0505] n)SEQ ID NO:39(CCR7_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:42(CCR7_MOUSE_N term),优选地其中Y8和Y17的一个或两个以及任选的Y20已被硫酸化,或

[0506] o)SEQ ID NO:43(CCR8_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:44(CCR8_MACFA_TRD)、SEQ ID NO:46(CCR8_HUMAN_N term,C＝X或S),或SEQ ID NO:47(CCR8_MACFA_N term,C＝X或S),优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0507] p)SEQ ID NO:45(CCR8_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:48(CCR8_MOUSE_N term,C＝X或S),优选地其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0508] q)SEQ ID NO:61(CCR9_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:64(CCR9_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:62(CCR9_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:65(CCR9_MACFA_N term),优选地至少Y28,并且还优选地Y17和/或Y37已被硫酸化,或

[0509] r)SEQ ID NO:63(CCR9_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:66(CCR9_MOUSE_N term),优选地其中至少Y28已被硫酸化,并且优选地Y19也已被硫酸化,或

[0510] s)SEQ ID NO:67(CCR10_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:70(CCR10_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:68(CCR10_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:71(CCR10_MACFA_N term),优选Y14和Y22中的至少一个或两者已被硫酸化,或

[0511] t)SEQ ID NO:69(CCR10_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:72(CCR10_MOUSE_N term),优选地其中Y14、Y17和Y22中的至少一个、两个或全部已被硫酸化,或

[0512] u)SEQ ID NO:73(CXCR1_HUMAN_TRD)或SEQ ID NO:76(CXCR1_HUMAN_N term),优选地其中Y27已被硫酸化,或

[0513] v)SEQ ID NO:74(CXCR1_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:77(CXCR1_MACFA_N term),优选地其中Y14和Y28中的至少一个已被硫酸化,或

[0514] w)SEQ ID NO:75(CXCR1_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:78(CXCR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y6已被硫酸化,或

[0515] x)SEQ ID NO:79(CXCR2_HUMAN_TRD)或SEQ ID NO:82(CXCR2_HUMAN_N term),优选地其中Y23和/或Y25已被硫酸化,或

[0516] y)SEQ ID NO:80(CXCR2_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:83(CXCR2_MACFA_N term),优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化,或

[0517] z)SEQ ID NO:81(CXCR2_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:84(CXCR2_MOUSE_N term),优选地其中Y24已被硫酸化,或

[0518] aa)SEQ ID NO:85(CXCR3_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:88(CXCR3_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:86(CXCR3_MACFA_TRD)、SEQ ID NO:89(CXCR3_MACFA_N term)、SEQ ID NO:87(CXCR3_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:90(CXCR3_MOUSE_N term),优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0519] bb)SEQ ID NO:91(CXCR4_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:94(CXCR4_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:92(CXCR4_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:95(CXCR4_MACFA_N term),优选地其中至少Y12和/或Y21已被硫酸化,或

[0520] cc)SEQ ID NO:93(CXCR4_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:96(CXCR4_MOUSE_N term),优选地其中至少Y23和/或Y14已被硫酸化,或

[0521] dd)SEQ ID NO:97(CXCR5_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:100(CXCR5_HUMAN_N term)、

SEQ ID NO:98(CXCR5_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:101(CXCR5_MACFA_N term),优选地Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化,或

[0522] ee)SEQ ID NO:99(CXCR5_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:102(CXCR5_MOUSE_N term),优选地其中至少Y3和/或Y14和/或Y20和/或Y26已被硫酸化,或

[0523] ff)SEQ ID NO:103(CXCR6_HUMAN_TRD)或SEQ ID NO:106(CXCR6_HUMAN_N term),优选地其中Y6和Y10中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0524] gg)SEQ ID NO:104(CXCR6_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:107(CXCR6_MACFA_N term),优选地其中Y4、Y7和Y39中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0525] hh)SEQ ID NO:105(CXCR6_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:108(CXCR6_MOUSE_N term),优选地其中Y11和Y15中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0526] ii)SEQ ID NO:157(CX3CR1_HUMAN_TRD)或SEQ ID NO:160(CX3CR1_HUMAN_N term),优选地其中至少Y14已被硫酸化,或

[0527] jj)SEQ ID NO:158(CX3CR1_MACFA_TRD),优选地其中至少Y20已被硫酸化,或

[0528] kk)SEQ ID NO:161(CX3CR1_MACFA_N term),优选地其中至少Y20或Y22已被硫酸化,或

[0529] ll)SEQ ID NO:159(CX3CR1_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:162(CX3CR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y15已被硫酸化,或

[0530] mm)SEQ ID NO:163(CXCR1_HUMAN_TRD)或SEQ ID NO:166(CXCR1_HUMAN_N term),优选地其中至少Y27已被硫酸化,或

[0531] nn)SEQ ID NO:164(CXCR1_MACMU_TRD),优选地其中至少Y14已被硫酸化,或

[0532] oo)SEQ ID NO:167(CXCR1_MACMU_N term),优选地其中至少Y14或Y28已被硫酸化,或

[0533] pp)SEQ ID NO:165(CXCR1_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:168(CXCR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y6已被硫酸化。

[0534] 优选地,根据当前方面的分离的多肽被固定,例如通过接头。固定可以在不限于合适的珠子、颗粒、蛋白或固体支持物的情况下发生。

[0535] 方面2-包含分离多肽的缀合物

[0536] 根据本发明的第二方面,提供了包含根据第一方面的分离的硫酸化多肽的缀合物。

[0537] 例如,缀合物可包含根据第一方面的第一实施方式的多肽。例如,缀合物可包含根据第一方面的第二实施方式的多肽。例如,缀合物可包含根据第一方面的第三实施方式的多肽。例如,缀合物可包含根据第一方面的第三实施方式的一些实施方式A、B、C的多肽。例如,缀合物可包含根据第一方面的第四实施方式的多肽。例如,缀合物可包含根据第一方面的第四实施方式的一些实施方式A、B、C的多肽。

[0538] 例如,分离的硫酸化多肽可以附着到标签或接头上用于固定或回收。合适的标签选自本领域已知的标签,例如小有机分子如生物素(其与链霉亲和素强烈且非共价结合)、其衍生物或短肽序列如Flag标签、HA标签、Myc标签或His标签(参见表4.1或实施例10.1.2)。对于某些应用,标签可以是蛋白质,例如人血清白蛋白(参见表4.1或实施例10.1.2),或载体蛋白,例如KLH、OVA或BSA,或更大的结构,例如珠子或磁性粒子。优选地,标

签可以通过TRD的C端或N端或趋化因子受体的N端连接，但也可以通过反应性残基或氨基酸侧链连接，例如TRD内的赖氨酸。在一些实施方式下，标签通过接头连接，接头可以是本领域已知的任何接头。合适的接头包括三氧杂十三聚糖-琥珀酰胺酸(Ttds)接头(参见表4.1)、β-丙氨酸、GABA、AEA、Ava、Ahx、PEG2间隔子、PEG3间隔子、PEG4间隔子、O1Pen、O2Oc或O1Pen-O1。

[0539] 方面3-抗原生产方法

[0540] 硫酸化肽可能难以合成，例如因为硫酸盐在酸性条件下是不稳定的(Houben-Weyl,Methods of Organic Chemistry Vol.E 22b,Synthesis of Peptides and Peptidomimetics,4th Edition,section 6.6.1.2Synthesis of Sulfated Tyrosine Peptides with Tyrosine O-Sulfate Synthons,p.440ff.in:Felix,Arthur et al.:2004)。

[0541] 根据第三方面，提供了一种生产根据第一方面的分离的硫酸化多肽或根据第二方面的缀合物的方法，其中所述方法包括合成分离的多肽和硫酸化相应的酪氨酸残基。

[0542] 根据第一方面的分离多肽的合成和相应酪氨酸残基的硫酸化可以如实施例5所述进行，或者可以根据本领域已知的任何其他方法进行。In 6.6.1章“Methods of Organic Chemistry Vol.E 22b,Synthesis of Peptides and Peptidomimetics”,Houben-Weyl描述了合成硫酸化酪氨酸肽的各种化学方法。本章，特别是这些方法，通过引用全部并入本文。

[0543] 例如，可以使用Bunschoten等(Bunschoten,Anton,et al."A general sequence independent solid phase method for the site specific synthesis of multiple sulfated-tyrosine containing peptides."Chemical communications 21(2009):2999-3001)先前描述的序列非依赖性固相方法进行合成，其全部内容通过引用并入本文。简而言之，根据Fmoc tBu策略合成肽，然后选择性地去保护待硫酸化的酪氨酸残基并引入受保护的硫酸基团。在硫酸化肽的合成完成后，通过酸解将其从树脂上裂解，除去硫酸盐保护基以外的保护基，从而防止在该步骤期间不期望的酸诱导的硫酸盐基的除去。最后，可以在微酸还原步骤中除去硫酸盐保护基团，使硫酸盐基团不受影响。

[0544] Chen等报道了一种获得含sY肽的短而有效的一步路线，其中通过基于Fmoc的固相合成策略将Fmoc保护的氟硫酸化酪氨酸(Y(OSO2F))结合到感兴趣的肽中(参见Chen,Wentao,et al."Synthesis of Sulfotyrosine-Containing Peptides by Incorporating Fluorosulfated Tyrosine Using an Fmoc-Based Solid-Phase Strategy."Angewandte Chemie 128.5(2016):1867-1870)，其全部内容通过引用并入本文。标准的同时肽树脂裂解和去除酸不稳定侧链保护基团产生含氟硫酸化酪氨酸的粗肽。碱性乙二醇作为溶剂和反应物，以高产率将氟硫酸化酪氨酸肽转化为磺基酪氨酸肽。

[0545] 多肽的全局硫酸化也是可能的，例如使用三氧化硫吡啶。根据本发明，如果所有酪氨酸都必须硫酸化，或者如果部分硫酸化多肽的“粗”混合物用于进一步步骤，则可以使用该路线。此外，硫酸化可以以酶的方式发生，例如在使用天然硫酸化酶或其工程化版本的生物转化反应中。优选地，相应酪氨酸的硫酸化可以化学或酶法进行。优选地，使用Fmoc-tBu策略合成分离的多肽。

[0546] 根据第三方面的一些实施方式，该方法包括纯化所获得的多肽。纯化可以例如通

过HPLC进行，例如使用C18柱。根据第三方面的一些实施方式，该方法包括多肽的分析表征。无限制地，可以使用光谱法或质谱法进行分析表征。

[0547] 方面4-抗原的用途/方法包括抗原的用途

[0548] 根据第四方面，提供了根据第一方面的分离的硫酸化多肽或根据第二方面的缀合物用于抗体产生、作为抗原或用于脱靶筛选和/或用于抗体表征的用途。例如，根据第一方面的分离的硫酸化多肽或根据第二方面的缀合物可用于产生全人抗体或其片段。例如，根据第一方面的分离的硫酸化多肽或根据第二方面的缀合物可用于产生交叉反应性抗体。

[0549] 根据第四方面的一些第一实施方式，提供了根据第一方面的分离的硫酸化多肽或根据第二方面的缀合物用于抗体产生的用途。特别地，如本文别处所述，根据第一方面的分离的硫酸化多肽可用于促进特异性识别趋化因子受体的抗体的产生。

[0550] 根据根据第四方面的一些第二实施方式，其可以与根据第四方面的第一实施方式相同或不同，根据第一方面的分离的硫酸化多肽或根据第二方面的缀合物用作抗原，例如选择特异性结合趋化因子受体的抗体、抗体片段或分子，参见实施例6和8。

[0551] 根据根据第四方面的一些第三实施方式，其可以与根据第四方面的第一和/或第二实施方式相同或不同，根据第一方面的分离的硫酸化多肽或根据第二方面的缀合物用于脱靶筛选，以选择不结合特定七次跨膜受体的抗体，例如趋化因子受体(脱靶受体)，参见实施例6和8。

[0552] 根据一些第四实施方式，根据第四方面的方法包括使用根据第一方面的分离的硫酸化多肽或根据第二方面的缀合物来表征抗体。优选地，所述抗体是根据本发明的抗体。例如，抗体的表征可包括使用ELISA、表面等离子体共振、质谱、竞争测定、染色、IHC、FACS或本领域已知的各种其他测定。

[0553] 方面5-抗体产生方法

[0554] 根据第五方面，提供了一种获得抗体或结合物的方法，该方法包括使用根据第一方面的分离的硫酸化多肽或根据第二方面的缀合物。

[0555] 根据一些第一实施方式，根据第五方面的方法包括使用根据第一方面的分离的硫酸化多肽或根据第二方面的缀合物作为抗原。

[0556] 根据第五方面的一些优选的第一实施方式，所述方法包括使用至少一种另外分离的多肽或其缀合物，其中所述至少一种另外分离的多肽包含以下的TRD

[0557] a)不同于第一七次跨膜受体的七次跨膜受体，或

[0558] b)在源自不同物种的第一七次跨膜受体中，

[0559] 优选地，其中所述至少一种另外分离的多肽是根据第一方面的分离的多肽。

[0560] 根据第五方面的第一实施方式的一些实施方式A，该方法包括使用至少一种另外分离的多肽或缀合物，优选地根据第一或第二方面，优选地作为抗原或用于脱靶选择。对于这些实施方式，第一分离的硫酸化多肽包含第一七次跨膜受体(例如趋化因子受体)的TRD，并且另外分离的多肽或缀合物包含不同于第一七次跨膜受体的七次跨膜受体的TRD。当另外分离的多肽或缀合物用作抗原时，该方法是用于产生识别至少两种不同的七次跨膜受体，例如两种不同趋化因子受体家族成员的抗体或结合物的方法。

[0561] 当另外分离的多肽或缀合物用于脱靶筛选时，该方法是用于产生仅识别特定的七次跨膜受体的抗体或结合物的方法，例如，以避免与另外趋化因子受体家族成员脱靶结合。

[0562] 根据第五方面的第一实施方式的一些实施方式B,该方法包括使用至少一种另外分离的多肽或缀合物,优选地根据第一或第二方面,作为抗原或用于脱靶选择。对于这些实施方式,第一分离的多肽包含第一物种的第一七次跨膜受体(例如人类趋化因子受体)的TRD,并且另外分离的多肽包括衍生自不同物种的相同七次跨膜受体(例如食蟹猴趋化因子受体)的TRD。例如,第一多肽可包含人趋化因子受体的TRD,第二多肽可包含食蟹猴趋化因子受体的TRD。

[0563] 这些实施方式B具有特别的优点,因为对于趋化因子受体,特别是对于CCR8,对人和合适的模型物种都具有交叉反应性的趋化因子抗体或结合物的产生是困难的。虽然跨膜结构域之间的总体一致性相对较高,但趋化因子受体的胞外结构域在不同趋化因子受体家族成员之间以及特定趋化因子受体的物种之间的一致性较低(图1、图2a)。然而,根据本发明,现在发现TRD内包含基序的小硫酸化酪氨酸对于特定的趋化因子受体来说足够保守以用于获得大量交叉反应性抗体。实施例6描述了针对人和食蟹猴的交叉反应抗体的产生,和实施例10.1.1显示了根据本发明的各种抗体在两个物种中的优异亲和力。与啮齿动物和小鼠相比,食蟹猴是首选的模型系统,因为小鼠模型未能预测免疫副作用。

[0564] 根据第五方面的方法可以是本领域已知的用于产生抗体的任何方法。例如,该方法可以是常规免疫方法,例如,其中根据第一方面的多肽与KLH缀合,并施用给合适的动物用于免疫。

[0565] 例如,免疫后,免疫动物的脾细胞可用于产生产生动物抗体的杂交瘤细胞,第二步可通过本领域已知的方法筛选与抗原特异性结合的抗体,例如ELISA以及结合脱靶(如果适用)。或者,可以在基于液滴的微流体系统或细胞培养测定中直接筛选脾细胞以产生与抗原结合的抗体。之后仅将选定的脾细胞直接应用于测序以获得抗体或杂交瘤生成的序列。另一种方法可以包括使用抗原与抗体库一起淘选,该抗体库例如可以是噬菌体展示库,例如不受其他地方描述的限制,或者哺乳动物图库。在筛选抗原上的文库后,可通过本领域已知的方法(例如ELISA或SPR)筛选富集的抗体以特异性结合抗原,如本文更详细描述的。

[0566] 根据第五方面的一些第二实施方式,其可以与第五方面第一实施方式相同或不同,根据第五个方面的用于获得抗体的方法是一种方法,该方法包括使用噬菌体展示文库、转基因动物或本领域可获得的用于产生包含人CDR的抗体的任何其他技术。

[0567] 在第五方面的第二实施方式的一些实施方式A中,该方法包括使用人噬菌体展示库,参见实施例6和实施例8。例如,噬菌体展示库可以是完全人抗体噬菌体展示库(例如BioInvent n-CoDeR Fab入库)。在一些优选实施方式中,噬菌体展示文库富含酪氨酸和/或组氨酸含量。在第一步骤中,包含在其外部显示抗体或抗体片段的噬菌体的噬菌体展示文库可与根据第一方面的固定化分离多肽或根据第二方面的缀合物结合,以允许与分离的多肽或缀合物相结合。

[0568] 在可在第一步骤之前或之后进行的任选的第二耗尽步骤中,包含在其外部显示抗体或抗体片段的噬菌体的噬菌体展示文库可与不同于第一步骤的分离多肽的的根据第一方面的固定化分离多肽或缀合物组合,以耗尽脱靶结合物。

[0569] 在可在第一步骤之前或之后或可在第二步骤之前或之后进行的任选的第三步骤中,包含在其外部展示抗体或抗体片段的噬菌体的噬菌体展示文库可与不同于第一步骤的分离多肽和任选的第二步骤的分离多肽的根据第一方面的固定化分离多肽或根据第二方

面的缀合物组合,以获得交叉反应性结合物。

[0570] 每个步骤都可以重复多次,例如一、二、三、四、五、六、七、八、九、十次或更多次。可以回收结合抗体或片段用于通过感染合适的细菌宿主进行扩增,并且可以如本领域已知的那样对DNA进行测序以获得七次跨膜受体抗体或片段的序列。

[0571] 在第五方面的第二实施方式的一些实施方式B中,根据第五方面获得抗体的方法是一种方法,该方法包括使用由Lonberg(Lonberg,Nils."Human antibodies from transgenic animals."Nature biotechnology 23.9(2005):1117-1125)所描述的转基因动物,其全部内容通过引用并入本文。例如转基因动物可以为XenoMouse(Abgenix Inc.,Fremont,CA,e.g.U.S.Patent No.5,939,598),HuMAb小鼠(GenPharm-Medarex,San Jose,CA),RenMab小鼠(Biocytogen),或本领域已知的用于产生全人抗体的任何其他动物。

[0572] 在第5方面的第二实施方式的一些实施方式C中,获得根据第5方面的抗体的方法是包括使用体外激活的B细胞的方法(U.S.Pat.Nos.5,567,610和5,229,275,其各自的全部内容都通过引用并入本文)。

[0573] 根据第五个方面的第三实施方式,提供了一种获得抗体或抗体片段或结合物的方法,其特异性结合人和/或食蟹猴和/或鼠CC或CXC趋化因子受体,该方法包括

[0574] a)(合成地)硫酸化包含富含酪氨酸的结构域(TRD)的多肽和

[0575] b)选择识别硫酸化多肽的抗体、抗体片段或结合物,和

[0576] c)任选地产生抗体、抗体片段或结合物。

[0577] 在一些实施方式中,根据第四方面的用途或根据第五方面的方法是获得具有如别处所述的有利特性的抗体的用途/方法,优选地其中抗体

[0578] a)包含人源CDR,和/或

[0579] b)是人、大鼠或鼠IgG抗体,优选地人IgG1抗体或鼠IgG2a抗体,和/或

[0580] c)对两种不同的七次跨膜受体具有交叉反应性,和/或

[0581] d)对人和食蟹猴七次跨膜受体具有交叉反应性,和/或

[0582] e)特征在于HCDR3区包含10%至34%的酪氨酸和/或2%至20%的组氨酸,优选地7%至20%的组氨酸和/或

[0583] f)不调节趋化因子受体的G蛋白非依赖性信号,和/或

[0584] g)是一种非内化抗体,或特征在于以低于同种型对照的内化的1.5、2、3、4、5、6、7或10倍内化进入具有内源靶标表达的细胞。

[0585] 根据当前方面的方法可用于获得大量结合趋化因子受体的抗体。有趣的是,相当多的这些抗体的特征在于它们与使用其他地方描述的常规方法获得的已知抗体不同的特性。

[0586] 方面6-抗原定义的抗体

[0587] 根据本发明,提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段或通过根据先前方面的方法或用途获得的结合物。

[0588] 如技术人员所理解的,抗体和/或结合片段本质上是"模块"的。在整个公开中,描述了包含抗体和/或结合片段的各种"模块"的各种具体方面和实施方式。作为具体的非限制性实例,描述了VH CDR、VH链、VL CDR和VL链或功能特征的各种具体实施方式。意图是所有特定实施方式可以彼此组合,如同每个特定组合被单独地明确描述一样。作为具体的非

限制性实例,描述了各种特定的功能实施方式。意图是所有特定实施方式可以彼此组合,如同每个特定组合被单独地明确描述一样。

[0589] 根据第六方面,提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段,(具体地)结合到第一分离的硫酸化多肽,该多肽包含七次跨膜受体的富含酪氨酸结构域(TRD),其中TRD的至少25%、至少50%或至少75%的酪氨酸残基被硫酸化。优选地,第一分离的硫酸化多肽还包含七次跨膜受体的LID结构域。优选地,TRD和LID结构域之间的半胱氨酸已被移除或已被交换成不同的氨基酸。

[0590] 优选地,第一分离的硫酸化多肽包含七次跨膜受体的N端,其包含其富含酪氨酸的结构域(TRD)并任选地包括其LID结构域,甚至更优选地,TRD的至少25%、至少50%或至少75%的酪氨酸残基被硫酸化。

[0591] 在优选地实施方式中,分离的抗体或其抗原结合片段以如下KD值结合其靶标:5E-8M,＜4E-8M,＜3E-8M,＜2E-8M,＜1E-8M,＜9E-9M,＜8E-9M,＜7E-9M,＜6E-9M,＜5E-9M,＜4E-9M,＜3E-9M,＜2.5E-9M,＜2E-9M,＜1.5E-9M,＜1E-9M,＜9E-10M,＜8E-10M,＜7E-10M,＜6E-10M,＜5E-10M,＜4E-10M,＜3E-10M,＜2.5E-10M,＜2E-10M,＜1.5E-10M,＜1E-10M,或＜9E-11M。例如,本发明的抗体可以以＜8E-9M和＞4E-10M之间的KD值结合其靶标。当分离的抗体或其抗原结合片段结合不止一个靶标时,最优选地其以相同数量级的亲和力结合其靶标。

[0592] 根据一些优选的实施方式,分离的抗体或其抗原结合片段

[0593] a)包括人源CDR,和/或

[0594] b)对人和食蟹猴具有交叉反应性,和/或

[0595] c)其特征在于HCDR3区包含10至34%的酪氨酸和/或7至20%的组氨酸,和/或

[0596] d)不调节七次跨膜受体的G蛋白非依赖性信号传导,和/或

[0597] e)是非内化抗体或其特征在于以低于同种型对照的内化的1.5、2、3、4、5、6、7或10倍的内化进入具有内源靶标表达的细胞,和/或

[0598] f)诱导ADCC和/或ADCP和/或

[0599] g)是人、大鼠或鼠IgG抗体,优选地人IgG1抗体或鼠IgG2a抗体,和/或

[0600] h)是scFv、Fab、Fab'或F(ab')2片段。

[0601] 根据第六方面的一些第一实施方式,七次跨膜受体是趋化因子受体。在这些第一实施方式中的一些中,七次跨膜受体是CC趋化因子受体或CXC趋化因子受体。在这些第一实施方式中的一些中,七次跨膜受体是CC趋化因子受体,例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9或CCR10。在这些第一实施方式中的一些优选实施方式中,七次跨膜受体是CCR8或CCR4。在这些第一实施方式的一些最优选的实施方式中,七次跨膜受体为CCR8。在一些第一实施方式中,七次跨膜受体是CXC趋化因子受体,例如CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5或CXCR6。在一些第一实施方式中,七次跨膜受体是CX3CR1或CXCR1。

[0602] 根据第六方面的一些第二实施方式,其可以与第六方面第一实施方式相同或不同,七次跨膜受体可以来自表达以TRD为特征的趋化因子受体的任何物种,例如人、猴、猕猴(食蟹猴)、猕猴(恒河猴)、啮齿动物、小鼠、大鼠、马、牛、猪、狗、猫和骆驼。在第六方面的这些第二实施方式中的一些中,七次跨膜受体是鼠的。在第六方面的这些第二实施方式中的一些最优选的实施方式中,七次跨膜受体是人。在第六方面的这些第二实施方式中的一些

中，七次跨膜受体是食蟹猴。在这些实施方式中的一些优选实施方式中，七次跨膜受体是人、食蟹猴或小鼠。在第六方面的这些优选的第二实施方式中的一些中，七次跨膜受体是人或食蟹猴。

[0603] 在一些优选的实施方式中，所述七次跨膜受体是人、食蟹猴或小鼠的七次跨膜受体，并且所述七次跨膜受体为

[0604] a)CC趋化因子受体，优选地CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9或CCR10，

[0605] b)CXC趋化因子受体，优选地CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5或CXCR6，或

[0606] c)CX3CR1或CXCR1。

[0607] 根据第6方面的一些第三实施方式，其可以与第6方面第一和/或第二实施方式相同或不同，(第一)分离的硫酸化多肽包含以下序列或与以下序列组成：

[0608] a)SEQ ID NO:1(CCR1_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:4(CCR1_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:2(CCR1_MACFA_TRD)、SEQ ID NO:5(CCR1_MACFA_N term)、SEQ ID NO:3(CCR1_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:6(CCR1_MOUSE_N term)，优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化，或

[0609] b)SEQ ID NO:7(CCR2_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:10(CCR2_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:8(CCR2_MACMU_TRD)或SEQ ID NO:11(CCR2_MACMU_N term)，优选地其中至少Y26已被硫酸化，或

[0610] c)SEQ ID NO:9(CCR2_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:12(CCR2_MOUSE_N term)，优选地其中至少Y37和/或Y39已被硫酸化，或

[0611] d)SEQ ID NO:13(CCR3_HUMAN_TRD)或SEQ ID NO:16(CCR3_HUMAN_N term)，优选地其中Y16和/或Y17已被硫酸化，或

[0612] e)SEQ ID NO:14(CCR3_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:17(CCR3_MACFA_N term)，优选地其中Y16已被硫酸化，或

[0613] f)SEQ ID NO:15(CCR3_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:18(CCR3_MOUSE_N term)，优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化，或

[0614] g)SEQ ID NO:19(CCR4_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:22(CCR4_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:20(CCR4_MACFA_TRD)、SEQ ID NO:23(CCR4_MACFA_N term)、SEQ ID NO:21(CCR4_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:24(CCR4_MOUSE_N term)，优选地其中至少Y22已被硫酸化并且优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化，或

[0615] h)SEQ ID NO:25(CCR5_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:28(CCR5_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:26(CCR5_MACMU_TRD)或SEQ ID NO:29(CCR5_MACMU_N term)，优选地其中Y3、Y10、Y14和Y15的两个、三个或全部已被硫酸化，或

[0616] i)SEQ ID NO:27(CCR5_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:30(CCR5_MOUSE_N term)，优选地其中Y10、Y12和Y16中的两个或三个已被硫酸化，或

[0617] j)SEQ ID NO:31(CCR6_HUMAN_TRD)或SEQ ID NO:34(CCR6_HUMAN_N term)，优选地其中Y18、Y26和Y27中的至少两个或三个已被硫酸化，或

[0618] k)SEQ ID NO:32(CCR6_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:35(CCR6_MACFA_N term)，优选地其中Y23、Y31和Y32中的至少两个或三个已被硫酸化，或

[0619] l)SEQ ID NO:33(CCR6_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:36(CCR6_MOUSE_N term)，优选

地其中Y13、Y18和Y19中的至少两个或三个已被硫酸化，或

[0620] m)SEQ ID NO:37(CCR7_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:40(CCR7_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:38(CCR7_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:41(CCR7_MACFA_N term)，优选地Y8和Y17中的一个或两个被硫酸化，或

[0621] n)SEQ ID NO:39(CCR7_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:42(CCR7_MOUSE_N term)，优选地其中Y8和Y17的一个或两个以及任选的Y20已被硫酸化，或

[0622] o)SEQ ID NO:43(CCR8_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:44(CCR8_MACFA_TRD)、SEQ ID NO:46(CCR8_HUMAN_N term,C＝X或S)，或SEQ ID NO:47(CCR8_MACFA_N term,C＝X或S)，优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，或

[0623] p)SEQ ID NO:45(CCR8_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:48(CCR8_MOUSE_N term,C＝X或S)，优选地其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化，或

[0624] q)SEQ ID NO:61(CCR9_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:64(CCR9_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:62(CCR9_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:65(CCR9_MACFA_N term)，优选地至少Y28，并且还优选地Y17和/或Y37已被硫酸化，或

[0625] r)SEQ ID NO:63(CCR9_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:66(CCR9_MOUSE_N term)，优选地其中至少Y28已被硫酸化，并且优选地Y19也已被硫酸化，或

[0626] s)SEQ ID NO:67(CCR10_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:70(CCR10_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:68(CCR10_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:71(CCR10_MACFA_N term)，优选Y14和Y22中的至少一个或两者已被硫酸化，或

[0627] t)SEQ ID NO:69(CCR10_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:72(CCR10_MOUSE_N term)，优选地其中Y14、Y17和Y22中的至少一个、两个或全部已被硫酸化，或

[0628] u)SEQ ID NO:73(CXCR1_HUMAN_TRD)或SEQ ID NO:76(CXCR1_HUMAN_N term)，优选地其中Y27已被硫酸化，或

[0629] v)SEQ ID NO:74(CXCR1_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:77(CXCR1_MACFA_N term)，优选地其中Y14和Y28中的至少一个已被硫酸化，或

[0630] w)SEQ ID NO:75(CXCR1_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:78(CXCR1_MOUSE_N term)，优选地其中至少Y6已被硫酸化，或

[0631] x)SEQ ID NO:79(CXCR2_HUMAN_TRD)或SEQ ID NO:82(CXCR2_HUMAN_N term)，优选地其中Y23和/或Y25已被硫酸化，或

[0632] y)SEQ ID NO:80(CXCR2_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:83(CXCR2_MACFA_N term)，优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化，或

[0633] z)SEQ ID NO:81(CXCR2_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:84(CXCR2_MOUSE_N term)，优选地其中Y24已被硫酸化，或

[0634] aa)SEQ ID NO:85(CXCR3_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:88(CXCR3_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:86(CXCR3_MACFA_TRD)、SEQ ID NO:89(CXCR3_MACFA_N term)、SEQ ID NO:87(CXCR3_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:90(CXCR3_MOUSE_N term)，优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化，或

[0635] bb)SEQ ID NO:91(CXCR4_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:94(CXCR4_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:92(CXCR4_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:95(CXCR4_MACFA_N term)，优选地其中至少Y12

和/或Y21已被硫酸化,或

[0636] cc)SEQ ID NO:93(CXCR4_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:96(CXCR4_MOUSE_N term),优选地其中至少Y23和/或Y14已被硫酸化,或

[0637] dd)SEQ ID NO:97(CXCR5_HUMAN_TRD)、SEQ ID NO:100(CXCR5_HUMAN_N term)、SEQ ID NO:98(CXCR5_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:101(CXCR5_MACFA_N term),优选地Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化,或

[0638] ee)SEQ ID NO:99(CXCR5_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:102(CXCR5_MOUSE_N term),优选地其中至少Y3和/或Y14和/或Y20和/或Y26已被硫酸化,或

[0639] ff)SEQ ID NO:103(CXCR6_HUMAN_TRD)或SEQ ID NO:106(CXCR6_HUMAN_N term),优选地其中Y6和Y10中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0640] gg)SEQ ID NO:104(CXCR6_MACFA_TRD)或SEQ ID NO:107(CXCR6_MACFA_N term),优选地其中Y4、Y7和Y39中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0641] hh)SEQ ID NO:105(CXCR6_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:108(CXCR6_MOUSE_N term),优选地其中Y11和Y15中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0642] ii)SEQ ID NO:157(CX3CR1_HUMAN_TRD)或SEQ ID NO:160(CX3CR1_HUMAN_N term),优选地其中至少Y14已被硫酸化,或jj)SEQ ID NO:158(CX3CR1_MACFA_TRD),优选地其中至少Y20已被硫酸化,或

[0643] kk)SEQ ID NO:161(CX3CR1_MACFA_N term),优选地其中至少Y20或Y22已被硫酸化,或

[0644] ll)SEQ ID NO:159(CX3CR1_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:162(CX3CR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y15已被硫酸化,或

[0645] mm)SEQ ID NO:163(CXCR1_HUMAN_TRD)或SEQ ID NO:166(CXCR1_HUMAN_N term),优选地其中至少Y27已被硫酸化,或

[0646] nn)SEQ ID NO:164(CXCR1_MACMU_TRD),优选地其中至少Y14已被硫酸化,或

[0647] oo)SEQ ID NO:167(CXCR1_MACMU_N term),优选地其中至少Y14或Y28已被硫酸化,或

[0648] pp)SEQ ID No:165(CXCR1_MOUSE_TRD)或SEQ ID NO:168(CXCR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y6已被硫酸化。

[0649] 根据第六方面的第三实施方式的一些实施方式A,(第一)分离的硫酸化多肽包含或由以下序列组成:

[0650] a.SEQ ID NO:1(CCR1_HUMAN_TRD),优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,或

[0651] b.SEQ ID NO:7(CCR2_HUMAN_TRD),优选地其中至少Y26已被硫酸化,或

[0652] c.SEQ ID NO:13(CCR3_HUMAN_TRD),优选地其中Y16和/或Y17已被硫酸化,或

[0653] d.SEQ ID NO:19(CCR4_HUMAN_TRD),优选地其中至少Y22已被硫酸化,并且优选地Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化;或

[0654] e.SEQ ID NO:25(CCR5_HUMAN_TRD),优选地其中Y3、Y10、Y14和Y15中的两个、三个或全部已被硫酸化,或

[0655] f.SEQ ID NO:31(CCR6_HUMAN_TRD),优选地其中Y18、Y26和Y27中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0656] g.SEQ ID NO:37(CCR7_HUMAN_TRD),优选地其中Y8和Y17中的一个或两个已被硫酸化,或

[0657] h.SEQ ID NO:43(CCR8_HUMAN_TRD),优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0658] i.SEQ ID NO:61(CCR9_HUMAN_TRD),优选地Y17和/或Y37也已被硫酸化,或

[0659] j.SEQ ID NO:67(CCR10_HUMAN_TRD),优选地其中Y14和Y22中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0660] k.SEQ ID NO:73(CXCR1_HUMAN_TRD),优选地其中Y27已被硫酸化,或

[0661] l.SEQ ID NO:79(CXCR2_HUMAN_TRD),优选地其中Y23和/或Y25已被硫酸化,或

[0662] m.SEQ ID NO:85(CXCR3_HUMAN_TRD),优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0663] n.SEQ ID NO:91(CXCR4_HUMAN_TRD),优选地其中至少Y12和/或Y21已被硫酸化,或

[0664] o.SEQ ID NO:97(CXCR5_HUMAN_TRD),优选地其中Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化,或

[0665] p.SEQ ID NO:103(CXCR6_HUMAN_TRD),优选地其中Y6和Y1 0中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0666] q.SEQ ID NO:157(CX3CR1_HUMAN_TRD),优选地其中至少Y14已被硫酸化,或

[0667] r.SEQ ID NO:163(CXCR1_HUMAN_TRD),优选地其中至少Y27已被硫酸化。

[0668] 根据第六方面的第三实施方式的一些实施方式B,(第一)分离的硫酸化多肽包含以下序列或由以下序列组成:

[0669] a)SEQ ID NO:3(CCR1_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,或

[0670] b)SEQ ID NO:9(CCR2_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y37和/或Y39已被硫酸化,或

[0671] c)SEQ ID NO:15(CCR3_MOUSE_TRD),优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化,或

[0672] d)SEQ ID NO:21(CCR4_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y22已被硫酸化,并且优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化;或

[0673] e)SEQ ID NO:27(CCR5_MOUSE_TRD),优选地其中Y10、Y12和Y16中的两个或三个已被硫酸化,或

[0674] f)SEQ ID NO:33(CCR6_MOUSE_TRD),优选地其中Y13、Y18和Y19中的两个或三个已被硫酸化,或

[0675] g)SEQ ID NO:39(CCR7_MOUSE_TRD),优选地其中Y8和Y17中的一个或两个以及任选地Y20已被硫酸化,或

[0676] h)SEQ ID NO:45(CCR8_MOUSE_TRD),优选地其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0677] i)SEQ ID NO:63(CCR9_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y28已被硫酸化,且优选地Y19也已被硫酸化;或

[0678] j)SEQ ID NO:69(CCR10_MOUSE_TRD),优选地其中Y14、Y17和Y22中的至少一个、两个或全部已被硫酸化,或

[0679] k)SEQ ID NO:75(CXCR1_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y6已被硫酸化,或

[0680] l)SEQ ID NO:81(CXCR2_MOUSE_TRD),优选地其中Y24已被硫酸化,或

[0681] m)SEQ ID NO:87(CXCR3_MOUSE_TRD),优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0682] n)SEQ ID NO:93(CXCR4_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y23和/或Y14已被硫酸化,或

[0683] o)SEQ ID NO:99(CXCR5_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y3和/或Y14和/或Y20和/或Y26已被硫酸化,或

[0684] p)SEQ ID NO:105(CXCR6_MOUSE_TRD),优选地其中Y11和Y15中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0685] q)SEQ ID NO:159(CX3CR1_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y15已被硫酸化,或

[0686] r)SEQ ID NO:165(CXCR1_MOUSE_TRD),优选地其中至少Y6已被硫酸化。

[0687] 根据第六方面的第三实施方式的一些实施方式C,(第一)分离的硫酸化多肽包含以下序列或由以下序列组成:

[0688] a)SEQ ID NO:2(CCR1_MACFA_TRD),优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,或

[0689] b)SEQ ID NO:8(CCR2_MACMU_TRD),优选地其中至少Y26已被硫酸化,或

[0690] c)SEQ ID NO:14(CCR3_MACFA_TRD),优选地其中Y16已被硫酸化,或

[0691] d)SEQ ID NO:20(CCR4_MACFA_TRD),优选地其中至少Y22已被硫酸化,并且优选地Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化,或

[0692] e)SEQ ID NO:26(CCR5_MACMU_TRD),优选地其中Y3、Y10、Y14和Y15中的两个、三个或全部已被硫酸化,或

[0693] f)SEQ ID NO:32(CCR6_MACFA_TRD),优选地其中Y23、Y31和Y32中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0694] g)SEQ ID NO:38(CCR7_MACFA_TRD),优选地其中Y8和Y17中的一个或两个已被硫酸化,或

[0695] h)SEQ ID NO:44(CCR8_MACFA_TRD),优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0696] i)SEQ ID NO:62(CCR9_MACFA_TRD),优选地其中至少Y28,优选地Y17和/或Y37也已被硫酸化,或

[0697] j)SEQ ID NO:68(CCR10_MACFA_TRD),优选地其中Y14和Y22中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0698] k)SEQ ID NO:74(CXCR1_MACFA_TRD),优选地其中Y14和Y28中的至少一个已被硫酸化,或

[0699] l)SEQ ID NO:80(CXCR2_MACFA_TRD),优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化,或

[0700] m)SEQ ID NO:86(CXCR3_MACFA_TRD),优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0701] n)SEQ ID NO:92(CXCR4_MACFA_TRD),优选地其中至少Y12和/或Y21已被硫酸化,或

[0702] o)SEQ ID NO:98(CXCR5_MACFA_TRD),优选地其中Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化,或

[0703] p)SEQ ID NO:104(CXCR6_MACFA_TRD),优选地其中Y4、Y7和Y39中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0704] q)SEQ ID NO:158(CX3CR1_MACFA_TRD),优选地其中至少Y20已被硫酸化,或

[0705] r)SEQ ID NO:164(CXCR1_MACMU_TRD),优选地其中至少Y14已被硫酸化。

[0706] 根据第六方面的一些第四实施方式,其可以与第六方面第一、第二和/或第三实施方式相同或不相同,第一分离的硫酸化多肽包含含有富含酪氨酸的结构域(TRD)和优选LID结构域的七次跨膜受体的N端,并且TRD的至少25%、至少50%或至少75%的酪氨酸残基被硫酸化,优选其中至少一个/位于TRD和LID结构域之间的半胱氨酸被移除或被交换成不同的氨基酸。

[0707] 根据第六方面的第四实施方式的一些实施方式A,(第一)分离的硫酸化多肽包含以下序列或由以下序列组成:

[0708] a)SEQ ID NO:4(CCR1_HUMAN_N term),优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,

[0709] b)SEQ ID NO:10(CCR2_HUMAN_N term),优选地其中至少Y26已被硫酸化,

[0710] c)SEQ ID NO:16(CCR3_HUMAN_N term),优选地其中Y16和/或Y17已被硫酸化,

[0711] d)SEQ ID NO:22(CCR4_HUMAN_N term),优选地其中至少Y22已被硫酸化并且优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化,

[0712] e)SEQ ID NO:28(CCR5_HUMAN_N term),优选地其中Y3、Y1 0、Y14和Y15中的两个、三个或全部已被硫酸化,

[0713] f)SEQ ID NO:34(CCR6_HUMAN_N term),优选地其中Y18、Y26和Y27中的至少两个或三个已被硫酸化,

[0714] g)SEQ ID NO:40(CCR7_HUMAN_N term),优选地其中Y8和Y17中的一个或两个已被硫酸化,

[0715] h)SEQ ID NO:46(CCR8_HUMAN_N term),优选地其中Y3、Y15和Y17的至少两个或全部已被硫酸化,

[0716] i)SEQ ID NO:64(CCR9_HUMAN_N term),优选地其中至少Y28,并且优选地Y17和/或Y37已被硫酸化,

[0717] j)SEQ ID NO:70(CCR10_HUMAN_N term),优选地其中Y14和Y22中的至少一个或两个已被硫酸化,

[0718] k)SEQ ID NO:76(CXCR1_HUMAN_N term),优选地其中Y27已被硫酸化,

[0719] l)SEQ ID NO:82(CXCR2_HUMAN_N term),优选地其中Y23和/或Y25已被硫酸化,

[0720] m)SEQ ID NO:88(CXCR3_HUMAN_N term),优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,

[0721] n)SEQ ID NO:94(CXCR4_HUMAN_N term),优选地其中至少Y12和/或Y21已被硫酸化,

[0722] o)SEQ ID NO:100(CXCR5_HUMAN_N term),优选地其中Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化,或

[0723] p)SEQ ID NO:106(CXCR6_HUMAN_N term),优选地其中Y6和Y1 0中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0724] q)SEQ ID NO:160(CX3CR1_HUMAN_N term),优选地其中至少Y14已被硫酸化,或

[0725] r)SEQ ID NO:166(CXCR1_HUMAN_N term),优选地其中至少Y27已被硫酸化。

[0726] 根据第六方面的第四实施方式的一些实施方式B,(第一)分离的硫酸化多肽包含以下序列或由以下序列组成:

[0727] a)SEQ ID NO:6(CCR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,或

[0728] b)SEQ ID NO:12(CCR2_MOUSE_N term),优选地其中至少Y37和/或Y39已被硫酸化,或

[0729] c)SEQ ID NO:18(CCR3_MOUSE_N term),优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化,或

[0730] d)SEQ ID NO:24(CCR4_MOUSE_N term),优选地其中至少Y22已被硫酸化并且优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化,或

[0731] e)SEQ ID NO:30(CCR5_MOUSE_N term),优选地其中Y10、Y12和Y16中的两个或三个已被硫酸化,或

[0732] f)SEQ ID NO:36(CCR6_MOUSE_N term),优选地其中Y13、Y18和Y19中的至少两个或三个已被硫酸化,

[0733] g)SEQ ID NO:42(CCR7_MOUSE_N term),优选地其中Y8和Y17中的一个或两个以及任选的Y20已被硫酸化,或

[0734] h)SEQ ID NO:48(CCR8_MOUSE_N term,C＝X或S),优选地其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0735] i)SEQ ID NO:66(CCR9_MOUSE_N term),优选地其中至少Y28已被硫酸化,并且优选地Y19也已被硫酸化,或

[0736] j)SEQ ID NO:72(CCR10_MOUSE_N term),优选地其中Y14、Y17和Y22中的至少一个、两个或全部已被硫酸化,或

[0737] k)SEQ ID NO:78(CXCR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y6已被硫酸化,或

[0738] 1)SEQ ID NO:84(CXCR2_MOUSE_N term),优选地其中Y24已被硫酸化,或

[0739] m)SEQ ID NO:90(CXCR3_MOUSE_N term),优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0740] n)SEQ ID NO:96(CXCR4_MOUSE_N term),优选地其中至少Y13和/或Y14已被硫酸化,或

[0741] o)SEQ ID NO:102(CXCR5_MOUSE_N term),优选地其中至少Y3和/或Y14和/或Y20和/或Y26已被硫酸化,或

[0742] p)SEQ ID NO:108(CXCR6_MOUSE_N term),优选地其中Y11和Y15中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0743] q)SEQ ID NO:162(CX3CR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y15已被硫酸化,或

[0744] r)SEQ ID NO:168(CXCR1_MOUSE_N term),优选地其中至少Y6已被硫酸化。

[0745] 根据第六方面的第四实施方式的一些实施方式C,(第一)分离的硫酸化多肽包含以下序列或由以下序列组成:

[0746] a)SEQ ID NO:5(CCR1_MACFA_N term),优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,或

[0747] b)SEQ ID NO:11(CCR2_MACMU_N term),优选地其中至少Y26已被硫酸化,或

[0748] c)SEQ ID NO:17(CCR3_MACFA_N term),优选地其中Y16已被硫酸化,或

[0749] d)SEQ ID NO:23(CCR4_MACFA_N term),优选地其中至少Y22已被硫酸化并且优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化,或

[0750] e)SEQ ID NO:29(CCR5_MACMU_N term),优选地其中Y3、Y10、Y14和Y15中的两个、三个或全部已被硫酸化,或

[0751] f)SEQ ID NO:35(CCR6_MACFA_N term),优选地其中Y23、Y31和Y32中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0752] g)SEQ ID NO:41(CCR7_MACFA_N term),优选地其中Y8和Y17中地一个或两个已被硫酸化,或

[0753] h)SEQ ID NO:47(CCR8_MACFA_N term),优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0754] i)SEQ ID NO:65(CCR9_MACFA_N term),优选地其中至少Y28,并且优选地Y17和/或Y37已被硫酸化,或

[0755] j)SEQ ID NO:71(CCR10_MACFA_N term),优选地其中Y14和Y22中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0756] k)SEQ ID NO:77(CXCR1_MACFA_N term),优选地其中Y14和Y28中的至少一个已被硫酸化,或

[0757] l)SEQ ID NO:83(CXCR2_MACFA_N term),优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化,或

[0758] m)SEQ ID NO:89(CXCR3_MACFA_N term),优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0759] n)SEQ ID NO:95(CXCR4_MACFA_N term),优选地其中至少Y12和/或Y21已被硫酸化,或

[0760] o)SEQ ID NO:101(CXCR5_MACFA_N term),优选地其中Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化,或

[0761] p)SEQ ID NO:107(CXCR6_MACFA_N term),优选地其中Y4、Y7和Y39中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0762] q)SEQ ID NO:161(CX3CR1_MACFA_N term),优选地其中至少Y20或Y22已被硫酸化,或

[0763] r)SEQ ID NO:167(CXCR1_MACMU_N term),优选地其中至少Y14或Y28已被硫酸化。

[0764] 根据第六方面的一些第五实施方式,其可以与第六方面中的第一、第二、第三和/或第四实施方式相同或不同,分离的抗体或其抗原结合片段(具体地)与包含七次跨膜受体的富含酪氨酸结构域(TRD)的第二分离的硫酸化多肽结合。

[0765] 优选地,第二分离的硫酸化多肽包含的TRD的七次跨膜受体

[0766] a)不同于第一分离的硫酸化多肽所包含的TRD的七次跨膜受体,或

[0767] b)第一分离的硫酸化多肽包含的TRD的相应的七次跨膜受体,但来自不同的物种。

[0768] 根据一些优选实施方式,包含七次跨膜受体的富含酪氨酸结构域(TRD)的第二分离的硫酸化多肽不同于包含七次跨膜受体的富含酪氨酸结构区(TRD)的第一分离的硫酸化多肽,并且是具有根据第六方面的第三和/或第四实施方式的实施方式A、B或C中任一项的序列的第一分离多肽。例如,第一分离的硫酸化多肽可包含第一物种的七次跨膜受体的

TRD,第二分离的硫酸化多肽可包含第二物种的七次跨膜受体的TRD,优选地其中所述物种是人和食蟹猴,或人和小鼠,或人与大鼠。

[0769] 根据第六方面的第五实施方式的一些实施方式A,抗体或片段特异性结合

[0770] a)包含SEQ ID NO:1(CCR1_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽,优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,和包含SEQ ID NO:2(CCR1_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽,优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,或

[0771] b)包含SEQ ID NO:7(CCR2_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽,优选地其中至少Y26已被硫酸化,和包含SEQ ID NO:8(CCL2_MACMU_TRD)的第二分离的硫酸化多肽,优选地其中至少Y26已被硫酸化,或

[0772] c)包含SEQ ID NO:13(CCR3_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽,优选地其中Y16和/或Y17已被硫酸化,和包含SEQ ID NO:14(CCR3_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽,优选地其中Y16已被硫酸化;或

[0773] d)包含SEQ ID NO:19(CCR4_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽,优选地其中至少Y22已被硫酸化,并且优选地Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化,和包含SEQ ID NO:20(CCR4_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽,优选地至少Y22已被硫酸化,优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化,或

[0774] e)包含SEQ ID NO:25(CCR5_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽,优选地其中Y3、Y10、Y14和Y15中的两个、三个或全部已被硫酸化,和包含SEQ ID NO:26(CCR5_MACMU_TRD)的第二分离的硫酸化多肽,优选地Y3、Y20、Y15和Y15中的两个、三个或全部已被硫酸化;或

[0775] f)包含SEQ ID NO:31(CCR6_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽,优选地其中Y18、Y26和Y27中的至少两个或三个已被硫酸化,和包含SEQ ID NO:32(CCR6_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽,优选地其中Y23、Y31和Y32中的至少二个或三个已被硫酸化,或

[0776] g)包含SEQ ID NO:37(CCR7_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽,优选地其中Y8和Y17中的一个或两个已被硫酸化,和包含SEQ ID NO:38(CCR7_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽,优选地其中Y18和Y17中的一个或两个已被硫酸化,或

[0777] h)包含SEQ ID NO:43(CCR8_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽,优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,和包含SEQ ID NO:44(CCR8_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽,优选地其中Y13、Y17和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0778] i)包含SEQ ID NO:61(CCR9_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽,优选地Y17和/或Y37已被硫酸化,和包含SEQ ID NO:62(CCR9_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽,优选地其中至少Y28,且优选地Y17和/或Y37也已被硫酸化,或

[0779] j)包含SEQ ID NO:67(CCR10_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽,优选地其中Y14和Y22中的至少一个或两个已被硫酸化,和包含SEQ ID NO:68(CCR10_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽,优选地Y14和Y12中的至少一个或两个已被硫酸化;或

[0780] k)包含SEQ ID NO:73(CXCR1_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽,优选地其中Y27已被硫酸化,和包含SEQ ID NO:74(CXCR1_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽,优选地其中Y14和Y28中的至少一个已被硫酸化,或

[0781] l)包含SEQ ID NO:79(CXCR2_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽,优选地其中

Y23和/或Y25已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:80(CXCR2_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化，或

[0782] m)包含SEQ ID NO:85(CXCR3_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化，以及包含SEQ ID NO:86(CXCR3_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中Y2和Y29的至少一个或两个已被硫酸化，或

[0783] n)包含SEQ ID NO:91(CXCR4_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y12和/或Y21已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:92(CXCR4_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y22和/或者Y21已被硫酸化，或

[0784] o)包含SEQ ID NO:97(CXCR5_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:98(CXCR5_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中Y23和Y2中的至少一个已被硫酸化，或

[0785] p)包含SEQ ID NO:103(CXCR6_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中Y6和Y10中的至少一个或两个已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:104(CXCR6_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中Y4、Y7和Y39中的至少两个或全部已被硫酸化，

[0786] q)包含SEQ ID NO:157(CX3CR1_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y14已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:158(CX3CR1_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y20已被硫酸化，或

[0787] r)包含SEQ ID NO:163(CXCR1_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y27已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:164(CXCR1_MACMU_TRD)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y14已被硫酸化。

[0788] 根据第六方面的第五实施方式的一些实施方式B，抗体或片段特异性结合

[0789] a)包含SEQ ID NO:4(CCR1_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:5(CCR1_MACFA_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化，

[0790] b)包含SEQ ID NO:10(CCR2_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y26已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:11(CCR2_MACMU_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y26已被硫酸化，

[0791] c)包含SEQ ID NO:16(CCR3_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中Y16和/或Y17已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:17(CCR3_MACFA_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中Y16已被硫酸化，

[0792] d)包含SEQ ID NO:22(CCR4_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y22已被硫酸化并且优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:23(CCR4_MACFA_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y22已被硫酸化并且优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化，

[0793] e)包含SEQ ID NO:28(CCR5_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中Y3、Y10、Y14和Y15中的两个、三个或全部已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:29(CCR5_MACMU_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中Y3、Y10、Y14和Y15中的两个、三个或全部已被硫酸化，

[0794] f)包含SEQ ID NO:34(CCR6_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其

中Y18、Y26和Y27中的至少两个或三个已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:35(CCR6_MACFA_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中Y23、Y31和Y32中的至少两个或三个已被硫酸化，

[0795] g)包含SEQ ID NO:40(CCR7_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中Y8和Y17中的一个或两者已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:41(CCR7_MACFA_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中Y8和Y17中的一个或两个已被硫酸化，

[0796] h)包含SEQ ID NO:46(CCR8_HUMAN_N term,C＝X或S)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:47(CCR8_MACFA_N term,C＝X或S)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，

[0797] i)包含SEQ ID NO:64(CCR9_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y28，并且还优选Y17和/或Y37已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:65(CCR9_MACFA_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y28，并且还优选Y17和/或Y37已被硫酸化，

[0798] j)包含SEQ ID NO:70(CCR10_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中Y14和Y22中的至少一个或两个已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:71(CCR10_MACFA_N term)的第二个分离的硫酸化多肽，优选地Y14和Y22中的至少一个或两个已被硫酸化，

[0799] k)包含SEQ ID NO:76(CXCR1_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中Y27已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:77(CXCR1_MACFA_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中Y14和Y28已被硫酸化，

[0800] l)包含SEQ ID NO:82(CXCR2_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中Y23和/或Y25已被硫酸化，以及包含SEQ ID NO:83(CXCR2_MACFA_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化，

[0801] m)包含SEQ ID NO:88(CXCR3_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:89(CXCR3_MACFA_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化，

[0802] n)包含SEQ ID NO:94(CXCR4_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y12和/或Y21已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:95(CXCR4_MACFA_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y12和/或Y21已被硫酸化，

[0803] o)包含SEQ ID NO:100(CXCR5_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:101(CXCR5_MACFA_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化，或

[0804] p)包含SEQ ID NO:106(CXCR6_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中Y6和Y10中的至少一个或两个已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:107(CXCR6_MACFA_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中Y4、Y7和Y39中的至少两个或全部已被硫酸化，或

[0805] q)包含SEQ ID NO:160(CX3CR1_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y14已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:161(CX3CR1_MACFA_N term)的第二分离的硫酸化多肽，优选地其中至少Y20或Y22已被硫酸化，或

[0806] r)包含SEQ ID NO:166(CXCR1_HUMAN_N term)的第一分离的硫酸化多肽,优选地其中至少Y27已被硫酸化,和包含SEQ ID NO:167(CXCR1_MACMU_N term)的第二分离的硫酸化多肽,优选地其中至少Y14或Y28已被硫酸化。

[0807] 根据第六方面的第五实施方式的一些实施方式C1,所述抗体或片段特异性结合包含根据第六方面的第三实施方式的一些实施方式A的序列的第一分离的硫酸化多肽和结合根据第六方面的第三实施方式的一些实施方式B或C的序列的第二分离的硫酸化多肽,其中优选地,所述第一和第二多肽包含相同受体但来自不同物种的TRD。

[0808] 根据第六方面的第五实施方式的一些实施方式C2,所述抗体或片段特异性结合包含根据第六方面的第四实施方式的一些实施方式A的序列的第一分离的硫酸化多肽和结合根据第六方面的第四实施方式的一些实施方式B或C的序列的第二分离的硫酸化多肽,其中优选地,所述第一和第二多肽包含相同受体但来自不同物种的TRD。

[0809] 根据第六方面的一些第六实施方式,其可以与第六方面的第一、第二、第三、第四和/或第五实施方式相同或不同,用于结合第一分离的硫酸化多肽和/或用于结合所述七次跨膜受体的抗体或抗原结合片段的解离常数或EC50低于200nM、150nM、100nM,10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5nM或0.25nM。

[0810] 根据第六方面的第六实施方式的一些实施方式A,用于结合第一分离的硫酸化多肽和/或用于结合所述七次跨膜受体的抗体或抗原结合片段的解离常数或EC50低于200nM,199nM,198nM,197nM,196nM,195nM,194nM,193nM,192nM,191nM,190nM,189nM,188nM,187nM,186nM,185nM,184nM,183nM,182nM,181nM,180nM,179nM,178nM,177nM,176nM,175nM,174nM,173nM,172nM,171nM,170nM,169nM,168nM,167nM,166nM,165nM,164nM,163nM,162nM,161nM,160nM,159nM,158nM,157nM,156nM,155nM,154nM,153nM,152nM,151nM,150nM,149nM,148nM,147nM,146nM,145nM,144nM,143nM,142nM,141nM,140nM,139nM,138nM,137nM,136nM,135nM,134nM,133nM,132nM,131nM,130nM,129nM,128nM,127nM,126nM,125nM,124nM,123nM,122nM,121nM,120nM,119nM,118nM,117nM,116nM,115nM,114nM,113nM,112nM,111nM,110nM,109nM,108nM,107nM,106nM,105nM,104nM,103nM,102nM,101nM,100nM,99nM,98nM,97nM,96nM,95nM,94nM,93nM,92nM,91nM,90nM,89nM,88nM,87nM,86nM,85nM,84nM,83nM,82nM,81nM,80nM,79nM,78nM,77nM,76nM,75nM,74nM,73nM,72nM,71nM,70nM,69nM,68nM,67nM,66nM,65nM,64nM,63nM,62nM,61nM,60nM,59nM,58nM,57nM,56nM,55nM,54nM,53nM,52nM,51nM,50nM,49nM,48nM,47nM,46nM,45nM,44nM,43nM,42nM,41nM,40nM,39nM,38nM,37nM,36nM,35nM,34nM,33nM,32nM,31nM,30nM,29nM,28nM,27nM,26nM,25nM,24nM,23nM,22nM,21nM,20nM,19nM,18nM,17nM,16nM,15nM,14nM,13nM,12nM,11nM,10nM,9nM,8nM,7nM,6nM,5nM,4nM,3nM,2nM,1nM,0.9nM,0.8nM,0.7nM,0.6nM,0.5nM,0.4nM,0.3nM,0.25nM,0.2nM,0.15nM,或0.1nM。

[0811] 优选地,用于结合第一分离的硫酸化多肽和/或所述七次跨膜受体的抗体或抗原结合片段的解离常数或EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5nM、0.25nM、0.2nM、0.15nM或0.1nM。

[0812] 优选地,EC50可以在过表达靶标的CHO细胞中测定。如例如实施例10.1.1中所公开的,用本文所公开的方法获得的抗体对其各自的靶标具有优异的亲和力。例如,TPP-21181、TPP-17578、TPP-19546、TPP-18206、TPP-21360和TPP-23411在工程化以表达CCR8的CHO细胞

中以4.8nM、1.7nM、0.8nM、0.6nM、～0.9nM或1.7nM的EC50结合人CCR8。此外，TPP-21281、TPP-17578、TPP-19546、TPP-18206、TPP-21360和TPP-23411以1.8nM、1nM、0.5nM、0.7nM、～0.55nM或0.9nM的EC50结合食蟹猴CCR8。此外，TPP-17578、TPP-19546、TPP-18206和TPP-21360以25nM、15nM、23nM或10nM的EC50与人调节性T细胞结合。此外，抗鼠CCR8抗体TPP-14099以3nM的EC50结合表达鼠CCR8的CHO细胞，和以13.2nM的EC50结合鼠iTregs，参见表10.1.1.5。

[0813] 根据第六方面的第六实施方式的一些实施方式B，其可以与第六方面第六实施方式的实施方式A相同或不同，用于结合第二分离的硫酸化多肽和/或用于结合第二七次跨膜受体的抗体或抗原结合片段的解离常数或EC50低于200nM，199nM，198nM，197nM，196nM，195nM，194nM，193nM，192nM，191nM，190nM，189nM，188nM，187nM，186nM，185nM，184nM，183nM，182nM，181nM，180nM，179nM，178nM，177nM，176nM，175nM，174nM，173nM，172nM，171nM，170nM，169nM，168nM，167nM，166nM，165nM，164nM，163nM，162nM，161nM，160nM，159nM，158nM，157nM，156nM，155nM，154nM，153nM，152nM，151nM，150nM，149nM，148nM，147nM，146nM，145nM，144nM，143nM，142nM，141nM，140nM，139nM，138nM，137nM，136nM，135nM，134nM，133nM，132nM，131nM，130nM，129nM，128nM，127nM，126nM，125nM，124nM，123nM，122nM，121nM，120nM，119nM，118nM，117nM，116nM，115nM，114nM，113nM，112nM，111nM，110nM，109nM，108nM，107nM，106nM，105nM，104nM，103nM，102nM，101nM，100nM，99nM，98nM，97nM，96nM，95nM，94nM，93nM，92nM，91nM，90nM，89nM，88nM，87nM，86nM，85nM，84nM，83nM，82nM，81nM，80nM，79nM，78nM，77nM，76nM，75nM，74nM，73nM，72nM，71nM，70nM，69nM，68nM，67nM，66nM，65nM，64nM，63nM，62nM，61nM，60nM，59nM，58nM，57nM，56nM，55nM，54nM，53nM，52nM，51nM，50nM，49nM，48nM，47nM，46nM，45nM，44nM，43nM，42nM，41nM，40nM，39nM，38nM，37nM，36nM，35nM，34nM，33nM，32nM，31nM，30nM，29nM，28nM，27nM，26nM，25nM，24nM，23nM，22nM，21nM，20nM，19nM，18nM，17nM，16nM，15nM，14nM，13nM，12nM，11nM，10nM，9nM，8nM，7nM，6nM，5nM，4nM，3nM，2nM，1nM，0.9nM，0.8nM，0.7nM，0.6nM，0.5nM，0.4nM，0.3nM，0.25nM，0.2nM，0.15nM，或0.1nM。

[0814] 优选地，用于结合第二分离的硫酸化多肽和/或用于结合第二七次跨膜受体的抗体或抗原结合片段的解离常数(KD)或EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5或0.25nM。

[0815] 根据第六方面的第六实施方式的一些实施方式AB，用于结合第一分离的硫酸化多肽和/或第一七次跨膜受体的抗体或抗原结合片段的解离常数(KD)或EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5nM或0.25nM，并且用于结合第二分离的硫酸化多肽和/或第二七次跨膜受体的抗体或抗原结合片段的解离常数(KD)或EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5nM或0.25nM。

[0816] 根据第六方面的一些第七实施方式，其可以与根据第六方面的第一、第二、第三、第四、第五和/或第六实施方式相同或不同，用于结合第一分离的硫酸化多肽的抗体的解离常数(KD)低于用于结合与第一分离的硫酸化多肽具有相同序列的第一分离的非硫酸化多肽的抗体的解离常量(KD)。优选地，所述抗体基本上不结合与第一分离的硫酸化多肽具有相同序列的第一分离的非硫酸化多肽。

[0817] 根据第六方面的第七实施方式的一些实施方式A，用于结合第一分离的非硫酸化多肽的抗体的解离常数或EC50高于100nM，150nM，200nM，250nM，300nM，350nM，400nM，450nM，500nM，600nM，700nM，800nM，900nM，1μM，1.25μM，1.5μM，1.75μM，2μM，2.25μM，2.5μM，

2.75μM,或3μM,或不可检测。优选地,用于结合第一分离的非硫酸化多肽的抗体的解离常数或EC50高于100nM、250nM、500nM、1μM、2μM或3μM,或不可检测。

[0818] 根据第六方面第七实施方式的一些实施方式B,其可以与第六方面的第七实施方式的实施方式A相同,用于结合第一分离的硫酸化多肽的抗体或片段的解离常数或EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5nM或0.25nM,并且用于结合第一分离的非硫酸化多肽的抗体或片段的解离常数或EC50高于10nM、25nM、50nM、100nM、250nM或500nM,或不可检测。

[0819] 根据第6方面的抗体可包含源自人、猴、猕猴(食蟹猴)、猕猴(恒河猴)、啮齿动物、小鼠、大鼠、马、牛、猪、狗、猫和骆驼的CDR。优选地,根据第6方面的抗体包含人、大鼠或小鼠衍生的CDR。

[0820] 根据第6方面的一些第8实施方式,其可以并且建议与第六方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六和/或第七实施方式组合,分离的抗体或抗原结合片段包含人源CDR。根据一些高度优选的实施方式,人源CDR与最近的人类生殖系的偏差不超过或小于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15。最接近的人类生殖系可以如本领域已知的那样确定,例如使用IgBLAST(Ye,Jian,et al."IgBLAST:an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool."Nucleic acids research 41.W1(2013):W34-W40.)用从IMGT人类生殖系数据库检索的数据。根据这些第8实施方式的抗体可如例如实施例6或8中所述或如本文别处所述获得。

[0821] 根据第6方面的一些第9实施方式,其可以并且建议与第6方面第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七或第八实施方式组合,分离的抗体或抗原结合片段对人和食蟹猴是交叉反应的,参见实施例10.1.1。优选地,用于结合人趋化因子受体的抗体或抗原结合片段的解离常数(KD)或EC50低于200nM、150nM、100nM、10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5或0.25nM,例如低于10nM,5nM,2.5nM,1nM,0.5或0.25nm。优选地,用于结合食蟹猴趋化因子受体的抗体或抗原结合片段的解离常数(KD)或EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5或0.25nM。

[0822] 根据第6方面的一些第10实施方式,其可以并且建议与第6方面第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八和/或第九实施方式组合,分离的抗体或抗原结合片段的特征在于HCDR3区的组成偏离平均HCDR3区。优选地,分离的抗体或抗原结合片段的特征在于HCDR3区,其包含10至34%的酪氨酸和/或至少一种组氨酸,优选地2至20%的组氨酸,最优选地7至20%的组氨酸。

[0823] 在第6方面的第10实施方式的一些实施方式A中,分离的抗体或抗原结合片段包含HCDR3,其含有

[0824] a)＞0和＜35%、＞8和＜34%,≥10和≤34%,或＞15和＜11%酪氨酸(Y)残基,和/或

[0825] b)＞0和≤16%,≥2和≤20%或≥7和≤20%组氨酸(H)残基,以及

[0826] c)优选地大于0≤18%,≥7和≤10%或≥0和≤7%精氨酸(R)残基,和/或

[0827] d)优选地大于0≤25%,≥7和≤16%或≥7和≤13%天冬氨酸(D)残基,和/或

[0828] e)优选地不含赖氨酸(K)残基和/或

[0829] f)优选地不含谷氨酸(E)残基。

[0830] 在第6方面的第10实施方式的一些实施方式B中,其可以与实施方式A相同或不同,分离的抗体或抗原结合片段包含HCDR3,其含有

[0831] a)＞0和＜47％，＞22和＜50％，＞10和＜34％，或＞15和＜47％带电氨基酸，和/或

[0832] b)＞0且＜32％，＞8且＜30％，或＞10且＜37％的带正电氨基酸，和/或

[0833] c)＞0和＜26％，≥7和＜16％、或＞7和＜14％带负电荷的氨基酸。

[0834] 在第6方面的第10实施方式的一些实施方式C中，其可以与实施方式A和/或B相同或不同，分离的抗体或抗原结合片段包含HCDR3，其总共含有＞0和≤42％，≥10和≤42％或≥36和≤43％的组氨酸和酪氨酸残基。

[0835] 本文公开了根据方面10的CCR8的每个实施方式和描述，例如具有必要的改变的一般的趋化因子受体抗体。本发明人认为，硫酸化的TRD基序而不是特定的CCR8序列促进酪氨酸和/或组氨酸的频率增加。

[0836] 根据第6方面的一些第11实施方式，其可以并且建议与第6方面第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九和/或第十实施方式组合，分离的抗体或抗原结合片段至少部分地调节CCR8信号传导。

[0837] 例如，根据本发明的抗体可以

[0838] a)阻断G蛋白非依赖性信号传导，和/或

[0839] b)阻断G蛋白依赖性信号传导，和/或

[0840] c)阻断G蛋白依赖性和G蛋白非依赖性信号传导，和/或

[0841] d)增加G蛋白非依赖性信号传导，和/或

[0842] e)增加G蛋白依赖性信号传导，和/或

[0843] f)增加G蛋白依赖性和G蛋白非依赖性信号传导。

[0844] 在特定情境下，调节指的是阻断配体诱导的G蛋白非依赖性信号传导和诱导G蛋白非依赖性信号传导。

[0845] 根据一些优选实施方式，抗体或片段不调节七次跨膜受体的G蛋白非依赖性信号传导。根据一些优选实施方式，抗体或片段不阻断配体诱导的靶蛋白的G蛋白非依赖性信号传导。根据一些优选实施方式，抗体或片段不诱导G蛋白非依赖性信号传导。

[0846] 根据一些优选实施方式，抗体或片段阻断G蛋白依赖性信号传导。G蛋白依赖性信号传导可通过趋化性测定或优选地通过钙通量测定进行分析，如本文别处所述。

[0847] 根据一些优选的实施方式，抗体或片段阻断趋化因子受体的G蛋白依赖性信号传导，但不阻断趋化因子受体的G蛋白质非依赖性信号传递，参见实施例10.4。趋化因子受体的G蛋白非依赖性信号传导是任何非G蛋白依赖性信号传导的信号传导活性。

[0848] 根据第六方面的一些第十二实施方式，其可以并且建议与第六方面的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十和第十一实施方式组合，分离的抗体或抗原结合片段是低内化或非内化的抗体或抗体结合片段。

[0849] 由于过度表达可能影响内化行为，并且不太适合在治疗环境中模拟内化，因此优选使用具有靶趋化因子受体内源性表达的模型细胞系来确定内化，参见实施例10.5。例如，可以在一个时间范围内或针对特定时间点确定内化。优选地，可以在内源性表达靶标的细胞中在15分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、6小时、12小时、24小时或48小时后测定内化。

[0850] 根据第6方面的第12实施方式的一些实施方式A，抗体或抗原结合片段具有与同种型对照的内化速率相同数量级的内化速率。

[0851] 根据第6方面的第12实施方式的一些实施方式B，抗体或抗原结合片段的特征在于以低于同种型对照内化的1.5、2、3、4、5、6、7或10倍的内化进入具有内源性靶表达的细胞。抗体的同种型对照可以如本领域已知的那样选择，以尽可能接近地匹配抗体的同种型，但不与靶标结合。

[0852] 根据第6方面的第12实施方式的一些实施方式C，抗体或抗原结合片段的特征在于以低于同种型对照内化的150％、175％、200％、300％、400％或500％的内化进入具有内源性靶表达的细胞，例如在15分钟、30分钟、1h、2h、3h、6h、12h、24h或48h后。

[0853] 根据第六方面的一些第十三实施方式，其可以并且建议与第六方面第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一和/或第十二实施方式组合，分离的抗体或抗原结合片段诱导表达抗体的靶受体的细胞的ADCC和/或ADCP。

[0854] 在第6方面的第13个实施方式的一些优选实施方式中，抗体或抗原结合片段是非糖基化的。

[0855] 在第6方面的第13实施方式的一些实施方式A1中，抗体或抗原结合片段以低于530nM、500nM、450nM、400nM、300nM或200nM的解离常数(KD)结合人Fcγ受体IIIA变体V176(CD16a)。优选地，KD可以使用表面等离子体共振来确定。

[0856] 在第6方面的第13实施方式的一些实施方式B1中，其可以与实施方式A1相同或不同，抗体或抗原结合片段在经由人效应细胞(例如人NK细胞)在表达靶受体的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。ADCC诱导可以用本领域已知的测定进行分析，例如根据实施例10.3.3ff或本文其他地方所述。优选地，用Treg细胞进行测定，其中至少80％或85％的Treg细胞表达CCR8。

[0857] 在第六方面的第十三实施方式的一些实施方式C1中，其可以与实施方式A1或B1相同或不同，表达靶受体的细胞的ADCC诱导的最大耗竭为至少30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、70％、80％、90％、95％、98％或99％。

[0858] 在第六方面的第十三实施方式的一些实施方式D1中，其可以与实施方式A1、B1或C1相同或不同，靶标表达细胞的ADCC诱导的耗竭的EC50低于500pM、400pM、300pM、200pM、100pM、50pM、25pM、20pM、12.5pM、10pM、5pM或2.5pM。

[0859] 在第6方面的第13实施方式的一些实施方式A2中，其可以与实施方式A1、B1、C1和/或D1相同或不同，抗体或抗原结合片段以低于30μM、20μM、10μM、5μM或1μM的解离常数(KD)与人FcγRIIA(CD32a)结合。

[0860] 在第六方面的第十三实施方式的一些实施方式B2中，其可以与实施方式A1、B1、C1和/或D1相同，并且可以与实施方式A2相同，抗体或抗原结合片段通过人效应细胞(例如人巨噬细胞)在表达靶受体的细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)。例如，人巨噬细胞可以是M2或M1巨噬细胞。

[0861] 在第六方面的第十三实施方式的一些实施方式C2中，其可以与实施方式A1、B1、C1和/或D1相同，并且可以与实施方式A2和/或B2相同，ADCP诱导的表达靶受体的细胞的最大耗竭为至少5、10、15、20、25、30、40或50％。

[0862] 在第六方面的第十三实施方式的一些实施方式D2中，其可以与实施方式A1、B1、C1和/或D1相同，并且可以与实施方式A2、B2和/或C2相同，ADCP诱导的激活的人调节性T细胞的耗竭的EC50低于1500pM、1000pM、500pM、250pM、200pM、150pM、100pM、75pM、50pM、25pM或

10pM。

[0863] 在第6方面的第13个实施方式中的一些优选实施方式中，提供了一种特异性结合趋化因子受体的分离的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或抗原结合片段

[0864] a)以低于530nM、500nM、450nM、400nM、300nM或200nM的解离常数(KD)结合人Fcγ受体IIIA变体V176(CD16a)，和/或

[0865] b)以低于30μM、20μM、10μM、5μM或1μM的解离常数(KD)与人FcγRIIA(CD32a)结合。

[0866] 在第6方面的第13个实施方式中的一些优选实施方式中，提供了一种特异性结合趋化因子受体的分离的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或抗原结合片段

[0867] a)通过人效应细胞(例如人NK细胞)在表达人趋化因子受体的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)，和/或

[0868] b)通过人效应细胞(例如人巨噬细胞)在表达人趋化因子受体的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)。

[0869] 在第6方面的第13个实施方式中的一些优选实施方式中，提供了一种特异性结合趋化因子受体的分离的抗体或其抗原结合片段，其中

[0870] a)表达人趋化因子受体的靶细胞中ADCC诱导的最大耗竭为至少25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、70％、80％、90％、95％、98％或99％，和/或

[0871] b)表达人趋化因子受体的靶细胞中ADCP诱导的最大耗竭为至少5％、10％、15％、20％、25％、30％、40％或50％，和/或

[0872] c)表达人趋化因子受体的靶细胞的最大耗竭为至少30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、70％、80％、90％、95％或99％。

[0873] 在第6方面的第13个实施方式中的一些优选实施方式中，提供了一种特异性结合趋化因子受体的分离的抗体或其抗原结合片段，其中

[0874] a)ADCC诱导的表达人趋化因子受体的靶细胞耗竭的EC50低于200pM、100pM、50pM、25pM、12.5pM、10pM或5pM和/或

[0875] b)ADCP诱导的表达人趋化因子受体的靶细胞耗竭的EC50低于500pM、250pM、200pM、150pM、100pM、75pM、50pM或25pM。

[0876] 根据第6方面的一些第14实施方式，其可以并且建议与第6方面第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二和/或第十三实施方式组合，分离的抗体或抗原结合片段包含人、大鼠或鼠IgG抗体，优选地人IgG1抗体或鼠IgG2a抗体，参见实施例6和8。

[0877] 根据第6方面的一些第15实施方式，其可以并且建议与第6方面第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三和/或第十四实施方式组合，分离的抗体或抗原结合片段是scFv、Fab、Fab′或F(ab′)2片段，参见实施例6。

[0878] 根据当前方面的抗体可以是缀合的，例如本文别处所讨论的。根据当前方面的抗体可用于治疗以表达七次跨膜受体的细胞参与为特征的肿瘤或疾病，例如本文别处所述。根据当前方面的抗体可在体内或体外用作诊断剂，例如本文别处所述。此外，提供了一种试剂盒，其包含根据当前方面的抗体以及使用说明书。

[0879] 根据第六方面的优选组合

[0880] 以下实施方式公开了第六方面的优选组合，从而强调了本发明的模块性质。根据

优选实施方式I,提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段,其特异性结合第一分离的硫酸化多肽,该多肽包含七次跨膜受体的富含酪氨酸的结构域(TRD)和任选的其LID结构域,其中TRD的酪氨酸残基的至少25%、至少50%或至少75%被硫酸化。根据优选的实施方式II,提供了根据优选的实施方式I的分离的抗体或抗原结合片段,其中TRD和LID结构域之间的半胱氨酸已被移除或已被交换成不同的氨基酸。根据优选的实施方式III,提供根据优选实施方式I或II的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述七次跨膜受体是人、食蟹猴或小鼠七次跨膜受体。根据优选实施方式IV,提供根据优选的实施方式I、II或III中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述七次跨膜受体是a)CC趋化因子受体,优选地CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9或CCR10,b)CXC趋化因子受体,优选地CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5或CXCR6,或c)CX3CR1或CXCR1。根据优选的实施方式V,提供根据优选的实施方式I、II、III或IV中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,所述第一分离的硫酸化多肽包含以下序列或由以下序列组成:

[0881] a.SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5,、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:6,优选地其中至少Y10和/或Y18已被硫酸化,或

[0882] b.SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:11,优选地其中至少Y26已被硫酸化,或

[0883] c.SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:12,优选地其中至少Y37和/或Y39已被硫酸化,或

[0884] d.SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16,优选地其中Y16和/或Y17已被硫酸化,或

[0885] e.SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17,优选地其中Y16已被硫酸化,或

[0886] f.SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18,优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化,或

[0887] g.SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:24,优选地其中至少Y22已被硫酸化,且优选地此外Y16、Y19和/或Y20已被硫酸化;或

[0888] h.SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:29,优选地其中Y3、Y10、Y14和Y15中的两个、三个或全部已被硫酸化,或

[0889] i.SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:30,优选地其中Y10、Y12和Y16中的两个或三个已被硫酸化,或

[0890] j.SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:34,优选地其中Y18、Y26和Y27中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0891] k.SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:35,优选地其中Y23、Y31和Y32中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0892] l.SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:36,优选地其中Y13、Y18和Y19中的至少两个或三个已被硫酸化,或

[0893] m.SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:41,优选地其中Y8和Y17中的一个或两个已被硫酸化,或

[0894] n.SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:42,优选地其中Y8和Y17中的一个或两个以及任选的Y20已被硫酸化,或

[0895] o.SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47,优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0896] p.SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:48,优选地其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0897] q.SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:62或SEQ ID NO:65,优选地其中至少Y28,优选地Y17和/或Y37也已被硫酸化,或

[0898] r.SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:66,优选地其中至少Y28已被硫酸化,且优选地Y19也已被硫酸化;或

[0899] s.SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:68或SEQ ID NO:71,优选地其中Y14和Y22中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0900] t.SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:72,优选地其中Y14、Y17和Y22中的至少一个、两个或全部已被硫酸化,或

[0901] u.SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:76,优选地其中Y27已被硫酸化,或

[0902] v.SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:77,优选地其中Y14和Y28中的至少一个已被硫酸化,或

[0903] w.SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:78,优选地其中至少Y6已被硫酸化,或

[0904] x.SEQ ID NO:79或SEQ ID NO:82,优选地其中Y23和/或Y25已被硫酸化,或

[0905] y.SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:83,优选地其中Y20和/或Y22已被硫酸化,或

[0906] z.SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:84,优选地其中Y24已被硫酸化,或

[0907] aa.SEQ ID NO:85,SEQ ID NO:88,SEQ ID NO:86,SEQ ID NO:89,SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:90,优选地其中Y27和Y29中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0908] bb.SEQ ID NO:91,SEQ ID No:94,SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:95,优选地其中至少Y12和/或Y21已被硫酸化,或

[0909] cc.SEQ ID NO:93或SEQ ID NO:96,优选地其中至少Y23和/或Y14已被硫酸化,或

[0910] dd.SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:98或SEQ ID NO:101,优选地其中Y3和Y27中的至少一个已被硫酸化,或

[0911] ee.SEQ ID NO:99或SEQ ID NO:102,优选地其中至少Y3和/或Y14和/或Y20和/或Y6已被硫酸化,或

[0912] ff.SEQ ID NO:103或SEQ ID NO:106,优选地其中Y6和Y10中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0913] gg.SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:107,优选地其中Y4、Y7和Y39中的至少两个或全部已被硫酸化,或

[0914] hh.SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:108,优选地其中Y11和Y15中的至少一个或两个已被硫酸化,或

[0915] ii.SEQ ID NO:157或SEQ ID NO:160,优选地其中至少Y14已被硫酸化,或

[0916] jj.SEQ ID NO:158,优选地其中至少Y20已被硫酸化,或

[0917] kk.SEQ ID NO:161,优选地其中至少Y20或Y22已被硫酸化,或

[0918] ll.SEQ ID NO:159或SEQ ID NO:162,优选地其中至少Y15已被硫酸化,或

[0919] mm.SEQ ID NO:163或SEQ ID NO:166,优选地其中至少Y27已被硫酸化,或

[0920] nn.SEQ ID NO:164,优选地其中至少Y14已被硫酸化或

[0921] oo.SEQ ID NO:167,优选地其中至少Y14或Y28已被硫酸化,或

[0922] pp.SEQ ID NO:165或SEQ ID NO:168,优选地其中至少Y6已被硫酸化。

[0923] 根据优选的实施方式VI,提供根据优选实施方式I、II、III、IV或V中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中用于结合第一分离的硫酸化多肽和/或所述七次跨膜受体的抗体的解离常数或EC50低于150nM、100nM、10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5或0.25nM。根据优选实施方式VII提供了根据优选实施方式I至VI中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中分离的抗体或抗原结合片段特异性结合第二分离的硫酸化多肽,其包含七次跨膜受体的TRD,优选地其中第二分离的硫酸化多肽包含TRD的七次跨膜受体

[0924] a.与第一分离的硫酸化多肽包含的TRD的七次跨膜受体不同,或

[0925] b.是第一分离的硫酸化多肽包含的TRD的相应的七次跨膜受体,但来自不同的物种。

[0926] 根据优选的实施方式VIII,提供了根据优选实施方式VII的分离的抗体或抗原结合片段,其中用于结合第二分离的硫酸化多肽和/或用于结合第二七次跨膜受体的抗体的解离常数或EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5或0.25nM。根据优选的实施方式IX,提供根据优选实施方式I至VIII中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中用于结合所述第一分离的硫酸化多肽的抗体的解离常数(KD)低于用于结合具有与所述第一分离的硫酸化的多肽相同的序列的第一分离的非硫酸化的肽的抗体的解离常量(KD)。根据优选的实施方式X,提供了根据优选的实施方式IX的分离的抗体或抗原结合片段,其中用于结合第一分离的非硫酸化多肽的抗体的解离常数和/或EC50高于150nM、250nM、500nM、1μM、2μM或3μM,或不可检测。根据优选的实施方式XI,提供了根据任何优选实施方式IX或X的分离的抗体或抗原结合片段,其中用于结合第一分离硫酸化多肽的抗体或片段的解离常数或EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5nM或0.25nM,并且其中用于结合第一分离的非硫酸化多肽的抗体或片段的解离常数高于10nM、25nM、50nM、100nM、250nM或500nM,或者不可检测。根据优选的实施方式XII,提供了根据任何优选实施方式I至XI的分离的抗体或抗原结合片段,其中抗体包含人、大鼠或小鼠衍生的CDR。根据优选的实施方式XIII,提供了根据优选实施方式I至XII中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体

[0927] a、包括人源CDR,和/或

[0928] b、对人和食蟹猴具有交叉反应性,和/或

[0929] c、其特征在于HCDR3区包含10至34%的酪氨酸和/或2至20%的组氨酸,和/或

[0930] d、不调节七次跨膜受体的G蛋白非依赖性信号传导,和/或

[0931] e、是非内化抗体或其特征在于以低于同种型对照内化的1.5、2、3、4、5、6、7或10倍内化进入含有内源性靶表达的细胞,和/或

[0932] f、诱导ADCC和/或ADCP

[0933] g、是人、大鼠或鼠IgG抗体,优选地人IgG1抗体或鼠IgG2a抗体,和/或

[0934] h、是scFv、Fab、Fab'或F(ab')2片段。

[0935] 根据优选的实施方式XIV,提供包含根据优选的实施方式I至XIII中任一项的抗体或抗原结合片段的缀合物,优选其中所述缀合物包含

[0936] a、放射性元素,

[0937] b、细胞毒性剂,例如auristatin、maytansinoid、驱动蛋白纺锤体蛋白抑制剂、烟酰胺磷酸核糖基转移酶抑制剂或吡咯并苯二氮杂平衍生物,

[0938] c、另一抗体或抗原结合片段,或

[0939] d、嵌合抗原受体。

[0940] 根据优选的实施方式XV,提供了根据优选的实施方式I至XIII中任一项的抗体或抗原结合片段或根据优选实施方式XIV的缀合物用于治疗特征在于涉及表达七次跨膜蛋白的细胞的肿瘤或疾病,任选地与靶向检查点抑制剂的抗体组合。根据优选的实施方式XVI,提供了根据优选实施方式I至XIII任一项的抗体或抗原结合片段或根据优选实施方案XIV的缀合物用作体内或体外诊断剂。根据优选的实施方式XVII,提供了试剂盒,其包含根据优选实施方式I至XIII中任一项的抗体或抗原结合片段或根据优选实施方式XIV的缀合物以及使用说明书。

[0941] 结合CCR8的抗体

[0942] 以下方面7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和18涉及特异性结合CCR8的抗体。虽然对每个方面进行了单独描述,但不同的结构或功能方面可以组合并建议彼此组合,除非明显不兼容。此外,除了明显不兼容的情况外,每个方面中的每个实施方式可以与相同或不同方面中的各个实施方式组合。

[0943] 如果没有明确说明,CCR8可以来自任何物种,例如人、猴、猕猴(食蟹猴)、猕猴(恒河猴)、啮齿动物、小鼠、大鼠、马、牛、猪、狗、猫和骆驼CCR8。结合来自至少两个物种(其中一个物种是人)的CCR8的抗体是高度优选的,并且建议与针对这些方面公开的每个实施方式组合。具有源自人的CDR的抗体是高度优选的并且建议与针对这些方面公开的每个实施方式组合。根据目前的方面,具有以至少21%的酪氨酸残基和/或至少2%、7%或10%的组氨酸的频率为特征的HCDR3结构域的抗体是高度优选的并且建议与针对以下方面的每个实施方式组合。根据目前的方面,高度优选同时诱导ADCC和ADCP的抗体,例如非岩藻糖基化抗体,并且建议与针对这些方面公开的每个实施方式组合。根据当前方面,低内化或非内化抗体或片段是高度优选的,并且建议与针对这些方面公开的每个实施方式组合。适用于所描述的每个方面的一些高度优选的特征在“根据‘所有方面’的优选组合”一节中描述。

[0944] 方面7-CCR8抗体结合硫酸化TRD

[0945] 人CCR8的细胞外结构域可以被分为四个区域:

[0946] (i)N端结构域,可细分为

[0947] a)由氨基酸1至24形成的膜远端富含酪氨酸结构域(TRD)(SEQ ID NO:43)

[0948] b)氨基酸位置25处的半胱氨酸,以及

[0949] c)LID结构域,由氨基酸26至35形成(SEQ ID NO:49)

[0950] (iii)根据SEQ ID NO:52的胞外结构域1(ECL1),

[0951] (iii)根据SEQ ID NO:55的胞外结构域2(ECL2),和

[0952] (iv)根据SEQ ID NO:58的胞外结构域3(ECL3)。

[0953] 根据第七方面,其可以与第六方面相同或不同,提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段,其特异性结合CCR8的硫酸化酪氨酸富集结构域。

[0954] 例如,抗体或抗原结合片段与第一分离的硫酸化多肽结合,所述多肽包括

[0955] a)CCR8的富含酪氨酸结构域(TRD)或

[0956] b)包含TRD的CCR8的N端,

[0957] 任选地,其中至少TRD和LID结构域之间的半胱氨酸已被移除或已被交换成不同的

氨基酸。根据当前方面的硫酸化多肽是其中优选至少25％、至少50％或至少75％的TRD的酪氨酸残基被硫酸化的多肽。当多肽包含含有TRD的CCR8的N端时，优选地TRD和LID结构域之间的半胱氨酸已被交换成丝氨酸或已被去除。

[0958] 在不受理论束缚的情况下，所提供的CCR8硫酸化模式的特异性识别似乎影响了抗体是否与CCL1(CCR8的天然配体)竞争，以及抗体是否以及如何激动或拮抗CCR8信号传导，例如根据第11方面所述。

[0959] 在根据当前方面的一些优选实施方式中，本发明抗体结合人和/或食蟹猴CCR8的硫酸化TRD，KD值为＜5E-8M，＜4E-8M，＜3E-8M，＜2E-8M，＜1E-8M，＜9E-9M，＜8E-9M，＜7E-9M，＜6E-9M，＜5E-9M，＜4E-9M，＜3E-9M，＜2.5E-9M，＜2E-9M，＜1.5E-9M，＜1E-9M，＜9E-10M，＜8E-10M，＜7E-10M，＜6E-10M，＜5E-10M，＜4E-10M，＜3E-10M，＜2.5E-10M，＜2E-10M，＜1.5E-10M，＜1E-10M，或＜9E-11M。例如，本发明抗体以＜8E-9M和＞4E-10M之间的KD值结合人和/或食蟹猴CCR8的硫酸化TRD。例如，本发明的抗体可以结合人和/或食蟹猴CCR8的硫酸化TRD，KD值在＜8E-9M和＞5.5E-10M之间。在这些实施方式的的一些进一步优选的实施方式，本发明的抗体结合以基本相同KD值结合人和/或食蟹猴CCR8的N端(即包含上述硫酸化TRD)。在这些实施方式的一些最优选实施方式中，本发明的抗体基本上不结合人和/或食蟹猴CCR8的非硫酸化TRD。

[0960] 在根据当前方面的一些优选实施方式中，本发明抗体结合人和/或食蟹猴CCR8的硫酸化N端，KD值为＜5E-8M，＜4E-8M，＜3E-8M，＜2E-8M，＜1E-8M，＜9E-9M，＜8E-9M，＜7E-9M，＜6E-9M，＜5E-9M，＜4E-9M，＜3E-9M，＜2.5E-9M，＜2E-9M，＜1.5E-9M，＜1E-9M，＜9E-10M，＜8E-10M，＜7E-10M，＜6E-10M，＜5E-10M，＜4E-10M，＜3E-10M，＜2.5E-10M，＜2E-10M，＜1.5E-10M，＜1E-10M，＜9E-11M，＜8E-11M，＜7E-11M，＜6E-11M，或＜5E-11M。例如，本发明抗体可以＜8E-9M和＞8E-11M之间的KD值结合人和/或食蟹猴CCR8的硫酸化N端。在这些实施方式中的一些进一步优选的实施方式中，本发明抗体以基本相同的KD值或相同数量级内的KD值结合人和/或食蟹猴CCR8的硫酸化TRD(即，上述硫酸化N端的子序列)。在这些实施方式中的一些最优选的实施方式中，本发明抗体基本上不结合人和/或食蟹猴CCR8的非硫酸化TRD。

[0961] 根据第7方面的一些第一实施方式，第一分离的硫酸化多肽包括

[0962] a)SEQ ID NO:43(CCR8_HUMAN_TRD)，优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，

[0963] b)SEQ ID NO:44(CCR8_MACFA_TRD)，优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，和/或

[0964] c)SEQ ID NO:45(CCR8_MOUSE_TRD)，优选地其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化。

[0965] 根据第7方面的一些第二实施方式，第一分离的硫酸化多肽包括

[0966] a)SEQ ID NO:46(CCR8_HUMAN_N term,C＝X或S)，优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，

[0967] b)SEQ ID NO:47(CCR8_MACFA_N term,C＝X或S)，优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，和/或

[0968] c)SEQ ID NO:48(CCR8_MOUSE_N term,c＝X或S)，优选地其中Y3、Y14和Y15中的至

少两个或全部已被硫酸化。

[0969] 根据第七方面的一些第三实施方式,其可以与第一和/或第二实施方式相同或不同,抗体或抗原结合片段以＜15nM、＜10nM、＜5nM、＜1nM或＜0.6nM的解离常数或EC50特异性结合第一分离的硫酸化多肽。

[0970] 根据这些实施方式中的一些优选实施方式,分离的抗体或其抗原结合片段以＜15nM、＜10nM、＜5nM、＜1nM或＜0.6nM的解离常数或EC50特异性结合

[0971] a)人CCR8或根据SEQ ID NO:46的分离多肽,其中Y3、Y15和Y17中至少两个或全部已被硫酸化,

[0972] b)食蟹猴CCR8或根据SEQ ID NO:47的分离的多肽,其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,和/或

[0973] c)鼠CCR8或根据SEQ ID NO:48的分离的多肽,其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化。

[0974] 根据第七方面的一些第四实施方式,其可以并且建议与第七方面第一、第二和/或第三实施方式组合,用于结合第一分离的硫酸化多肽的抗体的解离常数(KD)低于用于结合与第一分离的硫酸盐化多肽具有相同序列的分离的非硫酸化多肽抗体的解离常数(KD)。

[0975] 根据这些第四实施方式的一些实施方式A,用于结合分离的非硫酸化多肽的抗体的解离常数或EC50高于1pM,10nM,25nM,50nM,100nM,150nM,200nM,250nM,300nM,350nM,400nM,450nM,500nM,600nM,700nM,800nM,900nM,1μM,1.25μM,1.5μM,1.75μM,2μM,2.25μM,2.5μM,2.75μM,or 3μM,5μM或无法检测。优选地,用于结合分离的非硫酸化多肽的抗体的解离常数或EC50高于100nM、250nM、500nM、1μM、2μM或3μM,或不可检测。

[0976] 根据这些第四实施方式的一些实施方式B,其可以与这些第二实施方式的实施方式A相同,用于结合第一分离的硫酸化多肽的抗体的解离常数或EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5nM或0.25nM,并且用于结合分离的非硫酸化多肽的抗体的解离常数或EC50高于10nM、25nM、50nM、100nM、250nM或500nM,或者不可检测。

[0977] 方面8-包含人CDR的CCR8抗体

[0978] 根据第8方面,其可与第6或第7方面相同或不同,提供了一种(特别地)结合CCR8分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含人源CDR。最优选地,抗体或其抗原结合片段(特别地)结合CCR8的硫酸化TRD。根据一些优选实施方式,单个CDR与最近的人类生殖系的偏差少于1、2、3、4、5或6。根据一些高度优选的实施方式,人源CDR与最近的人类生殖系的偏差不超过或小于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15。最接近的人类生殖系可以如本领域已知的那样确定,例如使用IgBLAST用从IMGT人类生殖系数据库检索的数据,如本文其他地方所讨论的。

[0979] 虽然抗体与非人类CDR的人源化可以提高免疫原性,但残留免疫原性存在于CDR区(Harding,Fiona A.,et al."The immunogenicity of humanized and fully human antibodies:residual immunogenicity resides in the CDR regions."MAbs.Vol.2.No.3.Taylor&Francis.2010)。因此,认为根据当前方面的包含人源CDR和少量种系偏差的抗体具有作为治疗剂的优越适用性。

[0980] 包含人源性CDR的抗体可如本文所述获得,例如通过使用实施例4和6中所述的人噬菌体展示文库。在替代方案中,具有人CDR的抗体也可使用不能表达功能性内源性免疫球

蛋白但能表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠产生。此外，还可通过使用体外激活的B细胞生成包含人类CDR的抗体(参见U.S.Pat.Nos.5,567,610和5,229,275，各自的全部内容通过引用并入本文)。

[0981] 所提供的包含人源CDR的分离抗体或抗原结合片段优选也是根据方面9、10、11、12、13、14、15、16、17或18中任一项的抗体或其组合。

[0982] 方面9-交叉反应性CCR8抗体

[0983] 根据第九方面，其可以与第六、第七和/或第八方面相同或不同，提供了一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或抗原结合片段对来自至少两种物种的CCR8具有交叉反应性，优选地选自人、猴、猕猴(食蟹猴)、猕猴(恒河猴)、啮齿动物、小鼠、大鼠、马、牛、猪、狗、猫和骆驼，甚至更优选选自人、食蟹猴和小鼠。根据一些最优选的实施方式，抗体或抗原结合片段对人和食蟹猴CCR8是交叉反应的。

[0984] 在优选实施方式中，所述抗体或抗原结合片段以第一解离常数KD结合来自第一物种的CCR8，并以第二解离常数KD与来自第二物种的CCR8结合，其中所述第一解离常数和所述第二解离常量处于相同的数量级。如本领域技术人员所理解的，两个值之间的数量级差是10倍。

[0985] 交叉反应性抗CCR8抗体有利于治疗性抗体的开发，因为它们可用于非人类动物模型，以便在将抗体施用于人类之前，在药理学数据和安全性方面表征治疗剂。然而，在两个物种中具有相似结合行为的交叉反应抗体很难产生，因为CCR8中可用于抗体识别的部分在物种之间的同源性较低(见实施例2)。根据本发明，CCR8的交叉反应抗体可以通过使用包含物种之间具有更高保守性的基序的小硫酸化酪氨酸产生，使得以相同数量级亲和力结合来自两个或更多物种的CCR8的交叉反应抗体可以以简单方便的方式获得。更详细地说，抗体特异性结合硫酸化TRD基序，并且可以获得交叉反应抗体，因为这些硫酸化TRD基序在物种之间是保守的。

[0986] 在根据当前方面的一些优选实施方式中，本发明抗体结合人和食蟹猴CCR8的硫酸化TRD，KD值为＜5E-8M，＜4E-8M，＜3E-8M，＜2E-8M，＜1E-8M，＜9E-9M，＜8E-9M，＜7E-9M，＜6E-9M，＜5E-9M，＜4E-9M，＜3E-9M，＜2.5E-9M，＜2E-9M，＜1.5E-9M，＜1E-9M，＜9E-10M，＜8E-10M，＜7E-10M，＜6E-10M，＜5E-10M，＜4E-10M，＜3E-10M，＜2.5E-10M，＜2E-10M，＜1.5E-10M，＜1E-10M，或＜9E-11M。例如，本发明抗体可以＜8E-9M和＞4E-10M之间的KD值结合人和食蟹猴CCR8的硫酸化TRD。例如，本发明的抗体可以＜8E-9M和＞5.5E-10M之间的KD值结合人和食蟹猴CCR8的硫酸化TRD。在这些实施方式的一些进一步优选的实施方式中，本发明的抗体以基本相同的KD值或在一个数量级的KD结合人和食蟹猴CCD8的硫酸化N端(即包含前述的硫酸化TRD)。在这些实施方式的最优选实施方式中，本发明的抗体基本上不结合人和食蟹猴CCR8的非硫酸化TRD。

[0987] 在根据当前方面的一些优选实施方式中，本发明抗体结合人和食蟹猴CCR8的硫酸化N端，KD值为＜5E-8M，＜4E-8M，＜3E-8M，＜2E-8M，＜1E-8M，＜9E-9M，＜8E-9M，＜7E-9M，＜6E-9M，＜5E-9M，＜4E-9M，＜3E-9M，＜2.5E-9M，＜2E-9M，＜1.5E-9M，＜1E_9M，＜9E_10M，＜8E-10M，＜7E-10M，＜6E-10M，＜5E-10M，＜4E-10M，＜3E-10M，＜2.5E-10M，＜2E-10M，＜1.5E-10M，＜1E-10M，＜9E-11M，＜8E-11M，＜7E-11M，＜6E-11M，或＜5E-11M。例如，本发明抗体可以＜8E-9M和＞8E-11M之间的KD值结合人和食蟹猴CCR8的硫酸化N端。在这些实施方

式中的一些进一步优选的实施方式中，本发明抗体以基本相同的KD值或相同数量级的值结合人和食蟹猴CCR8的硫酸化TRD(即上述硫酸化N端的子序列)。在这些实施方式中的一些最优选的实施方式中，本发明抗体基本上不结合人和食蟹猴CCR8的非硫酸化TRD。

[0988] 根据第9方面的一些第一实施方式，抗体特异性结合

[0989] a)第一分离的硫酸化多肽，其包含SEQ ID NO:46(CCR8_HUMAN_N term,C＝X或S)，优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，和第二分离的硫酸多肽，其包含SEQ ID NO:47(CCR8_MACFA_N term,C＝X或者S)，优选地Y3、Y5和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化；或

[0990] b)包含SEQ ID NO:43(CCR8_HUMAN_TRD)的第一分离的硫酸化多肽，优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，和包含SEQ ID NO:44(CCR8_MACFA_TRD)的第二分离的硫酸多肽，优选地Y3、Y5和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化。

[0991] 优选地，用于结合人CCR8或用于结合第一分离的硫酸化多肽的抗体或抗原结合片段的EC50低于200nM、150nM、100nM、10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5或0.25nM，例如低于10nM，5nM，2.5nM，1nM，0.5或0.25nM。优选地，用于结合食蟹猴CCR8或用于结合第二分离的硫酸化多肽的抗体或抗原结合片段的EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5或0.25nM。在一些优选的实施方式中，抗体以基本相同的亲和力结合第一分离的硫酸化多肽和第二分离的硫酸多肽。

[0992] 根据第9方面的一些第二实施方式，抗体特异性结合

[0993] a)第一分离的硫酸化多肽，其包含SEQ ID NO:46(CCR8_HUMAN_N term,C＝X或S)，优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，和第二分离的硫酸多肽，其包含SEQ ID NO:48(CCR8_MOUSE_N term,C＝X和S)，优选地Y3、Y4和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化；或

[0994] b)第一分离的硫酸化多肽，其包含SEQ ID NO:43(CCR8_HUMAN_TRD)，优选地其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，和第二分离的硫酸多肽，其包含SEQ ID NO:45(CCR8_MOUSE_TRD)，优选地其中Y13、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化。

[0995] 优选地，用于结合人CCR8或用于结合第一分离的硫酸化多肽的抗体或抗原结合片段的EC50低于200nM、150nM、100nM、10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5或0.25nM，例如低于10nM，5nM，2.5nM，1nM，0.5或0.25nM。优选地，用于结合鼠CCR8或用于结合第二分离的硫酸化多肽的抗体或抗原结合片段的EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5或0.25nM。在一些优选实施方式中，抗体以基本相同的亲和力结合第一分离的硫酸化多肽和第二分离的硫酸多肽。

[0996] 所提供的分离的抗体或抗原结合片段优选也是根据方面7、8、10、11、12、13、14、15、16、17或18中任一方面的抗体或其组合。

[0997] 方面10-由HCDR3结构定义的CCR8抗体

[0998] 根据第十方面，其可以与第六、第七、第八和/或第九方面相同或不同，提供了一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或抗原结合片段的特征在于具有增加的组氨酸和/或酪氨酸频率的HCDR3区。如本领域技术人员所理解的，尽管单独讨论了每个氨基酸的频率，但是各个频率是相互关联的，并且建议将其组合，除非技术人员立即认识到它们的不相容性。对于CDR区的测定，本文使用Kabat的免疫球蛋白氨基酸残基编号系统，如有疑问，应为决定性的。

[0999] 令人惊讶地发现,根据本发明的CCR8抗体的特征在于HCDR3的酪氨酸残基频率显著高于具有匹配长度的随机全人类HCDR3(约10%,参见Zemlin,Michael,et al."Expressed murine and human CDR-H3 intervals of equal length exhibit distinct repertoires that differ in their amino acid composition and predicted range of structures."Journal of molecular biology 334.4(2003):733-749)。平均而言,本发明抗体的初始组包含约20.6%的酪氨酸残基,而优化的特异性人CCR8结合抗体的组包含HCDR3中平均21%的酪氨酸残基。

[1000] 此外,带正电荷的氨基酸的数量,特别是组氨酸残基的数量高于预期,特别是在具有改进的治疗特征的优化抗体组中,参见实施例9。平均而言,当总结时,组氨酸残基和酪氨酸残基占优化组的CCR8结合抗体的HCDR3中所有氨基酸的31%。

[1001] 有趣的是,包含硫酸化TRD的所用抗原的特征在于酪氨酸残基和特别高数量的负电荷,其通过硫酸化进一步增加。在不受理论束缚的情况下,本发明人认为本发明抗体的CDRH3中对高酪氨酸和组氨酸含量的偏好是由抗原的特定硫酸化基序引起的,并且HCDR3中高酪氨酸/组氨酸含量促进抗原的特异性识别。在不受理论束缚的情况下,本发明人进一步相信,这种特异性识别影响所获得的抗体作为CCR8的调节剂的特性,例如如方面11中所讨论的。

[1002] 在第十方面的一些高度优选的实施方式中,提供了一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段的特征在于HCDR3区,其包含10%至34%的酪氨酸和/或2%至20%的组氨酸。

[1003] 所提供的分离的抗体或抗原结合片段优选地也是根据方面7、8、9、11、12、13、14、15、16、17或18中任一方面的抗体或其组合。

[1004] 在第十方面的一些第一实施方式,分离的抗体或抗原结合片段包含含有如下的HCDR3

[1005] a)>0且<35%、>8且<34%、≥10且≤34%,或>15且<31%的酪氨酸(Y)残基,和/或

[1006] b)>0且≤16%、≥2且≤20%或≥7且≤20%组氨酸(H)残基,和

[1007] c)优选地≥0且≤18%、≥7且≤10%或≥0且≤7%精氨酸(R)残基,和/或

[1008] d)优选地≥0且≤25%、≥7且≤16%或≥7且≤13%的天冬氨酸(D)残基,和/或

[1009] e)优选地没有赖氨酸(K)残基,和/或

[1010] f)优选地没有谷氨酸(E)残基。

[1011] 在第十方面的某些第二实施方式中,其可以与第一实施方式相同或不同,分离的抗体或抗原结合片段包含具有以下的HCDR3

[1012] a)>0且<47%、>22且<50%、>10且<34%,或>15且<47%带电氨基酸,和/或

[1013] b)>0且<32%,>8且<30%,或>10且<37%带正电荷的氨基酸,和/或

[1014] c)>0且<26%,≥7且<16%,或>7且<14%带负电荷的氨基酸。

[1015] 在第十方面的某些第三实施方式中,其可与第一和/或第二实施方式相同或不同,分离的抗体或抗原结合片段包含具有>0且≤42%、≥1 0且≤42%或≥36且≤43%组氨酸和酪氨酸残基总数的HCDR3。

[1016] 酪氨酸(Y)

[1017] 在一些优选的实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含具有33%、31%、25%、23%、21%、20%、18%、15%、10%、9%、8%或0%的酪氨酸的HCDR3。在一些高度优选的实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含具有(a)>0且<35%、(b)>8且<34%、(c)>10且<34%、或(d)>15和<31%酪氨酸的HCDR3。

[1018] 在一些实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含具有>8,>9,>10,>11,>12,>13,>14,>15,>16,>17,>18,>19,>20,>21,>22,>23,>24,>25,>26,>27,>28,>29,>30,>31,>32,>33%酪氨酸残基的HCDR3。在一些实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含具有<35,<34,<33,<32,<31,<30,<29,<28,<27,<26,<25,<24,<23,<22,<21,<20,<19,<18,<17,<16,<15,<14<13,<12,<11,<10,<9或<8%酪氨酸残基的HCDR3。

[1019] 在一些实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含具有>0且<34%,>1且<34%,>2且<34%,>3且<34%,>4且<34%,>5且<34%,>6且<34%,>7且<34%,>8且<34%,>9且<34%,>10且<34%,>11且<34%,>12且<34%,>13且<34%,>14且<34%,>15且<34%,>16且<34%,>17且<34%,>18且<34%,>19且<34%,>20且<34%,>21且<34%,>22且<34%,>23且<34%,>24且<34%,>25且<34%,>26且<34%,>27且<34%,>28且<34%,>29且<34%or>30且<34%酪氨酸残基的HCDR3。

[1020] 在一些实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含具有>0且<36%,>0且<35%,>0且<34%,>0且<33%,>0且<32%,>0且<31%,>0且<30%,>0且<29%,>0且<28%,>0且<27%,>0且<26%,>0且<25%,>0且<24%,>0且<23%,>0且<22%,>0且<21%,>0且<20%,>0且<19%,>0且<18%,>0且<17%,>0且<16%,or>0且<15%,>0且<14%,>0且<13%,>0且<12%,>0且<11%,>0且<10%,>0且<9%,>0且<8%,>0且<7%,,>0且<6%,>0且<5%酪氨酸残基的HCDR3。

[1021] 带电荷aa

[1022] 在一些优选的实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含具有47%、39%、31%、28%、27%、25%、23%、20%、18%、17%、16%、15%、9%或0%带电氨基酸的HCDR3。在一些高度优选的实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含具有(a)>0且<47%、(b)>22且<50%、(c)>10且<34%、或(d)>15且<47%带电氨基酸的HCDR3。

[1023] 正电荷aa

[1024] 在一些优选的实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含具有31%、23%、18%、15%、10%、8%、7%或0%带正电荷的氨基酸的HCDR3。在一些高度优选的实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含具有(a)>0且<32%、(b)>8且<30%、或(c)>10且<37%带正电荷氨基酸的HCDR3。

[1025] 负电荷aa

[1026] 在一些优选的实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含具有25%、17%、15%、11%、10%、9%、8%、7%或0%带负电荷的氨基酸的HCDR3。在一些高度优选的实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含具有(a)>0且<26%,(b)≥7且<16%,或(c)>7且

＜14％的带负电荷氨基酸的HCDR3。

[1027] 组氨酸(H)

[1028] 在一些优选的实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段包含具有0％、3％、7％、8％、10％或15％组氨酸残基的HCDR3。优选地，分离的抗体或抗原结合片段包含具有至少一个组氨酸残基的HCDR3。在一些高度优选的实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段包含具有(a)＞0且≤16％、(b)≥2且≤20％或(c)≥7且≤20％组氨酸残基的HCDR3。

[1029] 在一些实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段包含具有≥0，＞0，＞1，＞2，＞3，＞4，＞5，＞6，＞7，＞8，＞9，＞10，＞11，＞12，＞13，＞14，＞15，＞16，＞17，＞18，＞19，＞20％组氨酸残基的HCDR3。在一些实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段包含具有＜20，＜19，＜18，＜17，＜16，＜15，＜14＜13，＜12，＜11，＜10，＜9，＜8，＜7，＜6，＜5，＜4，＜3，＜2或＜1％组氨酸残基的HCDR3。

[1030] 在一些实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段包含具有＞0且＜24％，＞1且＜24％，＞2且＜24％，＞3且＜24％，＞4且＜24％，＞5且＜24％，＞6且＜24％，＞7且＜24％，＞8且＜24％，＞9且＜24％，＞10且＜24％，＞11且＜24％，＞12且＜24％，＞13且＜24％，＞14且＜24％，＞15且＜24％，＞16且＜24％，＞17且＜24％，＞18且＜24％，＞19且＜24％，＞20且＜24％，＞21且＜24％，＞22且＜24％or＞23且＜24％组氨酸残基的HCDR3。

[1031] 在一些实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段包含具＞0且＜24％，＞0且＜23％，＞0且＜22％，＞0且＜21％，＞0且＜20％，＞0且＜19％，＞0且＜18％，＞0且＜17％，＞0且＜16％，or＞0且＜15％，＞0且＜14％，＞0且＜13％，＞0且＜12％，＞0且＜11％，＞0且＜10％，＞0且＜9％，＞0且＜8％，＞0且＜7％，＞0且＜6％，＞0且＜5％，＞0且＜4％，＞0且＜3％，＞0且＜2％or＞0且＜1％组氨酸残基的HCDR3。

[1032] 组氨酸+酪氨酸

[1033] 在一些优选的实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段包含具有42％、38％、33％、31％、30％、24％、23％、18％、15％、10％、9％或0％组氨酸和酪氨酸残基总数的HCDR3。优选地，分离的抗体或抗原结合片段包含具有至少一个组氨酸残基的HCDR3。在一些高度优选的实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段包含具有(a)＞0且≤42％、(b)≥10且≤42％或(c)≥36且≤43％的组氨酸和酪氨酸残基总数的HCDR3。

[1034] 精氨酸(R)

[1035] 在一些优选的实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段包含具有0％、7％、8％、10％、15％或18％精氨酸残基的HCDR3。在一些高度优选的实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段包含具有(a)＞0且≤18％、(b)≥7且≤10％或(c)≥0且≤7％精氨酸残基的HCDR3。

[1036] 赖氨酸(K)

[1037] 在一些实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段包含具有0％至8％赖氨酸残基的HCDR3。在一些实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段包含不具有赖氨酸残基的HCDR3。

[1038] 天冬氨酸(D)

[1039] 在一些优选的实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段包含具有0％、7％、8％、9％、10％、11％、15％、16％、17％或25％天冬氨酸残基的HCDR3。在一些高度优选的实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段包含具有(a)＞0且≤25％、(b)≥7且≤16％或(c)≥7且

≤13%的天冬氨酸残基的HCDR3.

[1040] 谷氨酸(E)

[1041] 在一些实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含具有0%、8%或9%谷氨酸残基的HCDR3。在一些高度优选的实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含不含谷氨酸残基的HCDR3。

[1042] 长度

[1043] 在一些实施方式中,分离的抗体或抗原结合片段包含长度为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸。优选地,分离的抗体或抗原结合片段包含具有10、11、12或13个氨基酸残基或8至13个氨基酸残基长度的HCDR3。

[1044] 方面11-阻断/中性CCR8抗体

[1045] 抗体调节CCR8信号传导的方式有多种。例如,抗体可以

[1046] a)阻断G蛋白非依赖性信号传导,

[1047] b)阻断G蛋白依赖性信号传到,

[1048] c)阻断G蛋白依赖性和G蛋白非依赖性信号传导,

[1049] d)增加G蛋白非依赖性信号传导,

[1050] e)增加G蛋白依赖性信号传导,

[1051] f)增加G蛋白依赖性和G蛋白非依赖性信号传导。

[1052] 根据第十一方面,其可以与第六、第七、第八、第九和/或第十方面相同或不同,提供了一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段至少部分调节CCR8信号传导。

[1053] 对于CCR8,G蛋白非依赖性信号传导通路是β-arrestin信号传导(实施例10.4.1)、磷酸Erk1/2信号传导(Erk1/2的磷酸化)和磷酸Akt信号传导(AKT的磷酸化)(实施例10.4.2)。可以根据对这三种G蛋白非依赖性信号传导通路的影响来定义拮抗剂或激动剂的其他亚型。

[1054] 根据第11个方面的一些第一实施方式,抗体或抗原结合片段

[1055] a)不阻断CCL1诱导的β-arrestin信号传导和/或

[1056] b)不诱导ERK1/2磷酸化和/或

[1057] c)不诱导AKT磷酸化。

[1058] 实施例10.4.1显示现有技术抗体433H和L268G8有效阻断CCL1诱导的β-arrestin信号传导,例如IC50值低于20nM(参见表10.4.1.1),而本发明的抗体如TPP-23411无法确定IC50值。

[1059] 根据第十一方面的第一实施方式的一些实施方式A,抗体或抗原结合片段不阻断CCL1诱导的β-arrestin信号传导。如有疑问,如果IC50低于100nM,抗体阻断CCL1诱导的β-arrestin信号传导。如有疑问,如果IC50≥100nM,或者如果无法使用所述测定系统确定IC50,则抗体不会阻断CCL1诱导的β-arrestin信号传导。如第12方面所述,CCL1诱导的β-arrestin信号传导与受体内化有关。

[1060] 实施例10.4.2、图27、28显示现有技术抗体在表达人CCR8的CHO细胞或人激活Tregs中诱导Erk1/2的磷酸化,例如15分钟后,至少增加1.5倍。相反,本发明的抗体TPP-23411没有诱导Erk1/2的显著磷酸化。

[1061] 根据第十一方面的第一实施方式的一些实施方式B，抗体或抗原结合片段不诱导ERK1/2磷酸化。如有疑问，如果-使用本文所述的测定-可以检测到Erk1/2磷酸化水平比对照至少增加1.5倍，则抗体诱导Erk1/2的磷酸化。如有疑问，如果未检测到Erk1/2的磷酸化水平显著增加或增加低于对照的1.5倍，则抗体不诱导Erk1/2的磷酸化。

[1062] 实施例10.4.2，图30显示现有技术抗体诱导AKT的磷酸化，例如15分钟后至少增加1.5倍。相反，本发明的抗体TPP-23411没有诱导AKT的显著磷酸化。

[1063] 根据第11方面的第一实施方式的一些实施方式C，抗体或抗原结合片段不诱导AKT磷酸化。如有疑问，如果-使用本文所述的测定-可以检测到AKT磷酸化水平比对照增加至少1.5倍，则抗体诱导AKT的磷酸化。如有疑问，如果未检测到AKT磷酸化水平显著增加或增加低于对照的1.5倍，则抗体不诱导AKT磷酸化。

[1064] 不显示诱导G蛋白非依赖性信号通路(如AKT或ERK1/2磷酸化)的抗体或片段被认为在治疗中具有优势，因为诱导G蛋白依赖性信号通路可能导致不需要的作用和副作用。

[1065] 为了分析G蛋白依赖性信号传导，本领域已知的和本文描述的Ca通量测定可以用作读数。大多数测试的本发明抗体被发现是完全有效的G蛋白依赖性Ca信号转导的拮抗剂，然而，与现有技术抗体相比，可以确定IC50的差异。

[1066] 实施例10.4.3表明，几种测试的抗CCR8抗体阻断了CCL1诱导的G蛋白依赖性Ca信号传导，例如IC50值为低nM甚至亚nM范围内。

[1067] 根据第十一方面的一些第二实施方式，其可以与第一实施方式相同或不同，抗体或抗原结合片段阻断CCL1诱导的钙信号传导。在这些实施方式的一些优选实施方式中，抗体或抗原结合片段阻断CCL1诱导的钙信号传导，例如IC50＜1nM、＜0.5nM或＜0.01nM。

[1068] 根据第十一方面的一些第三实施方式，其可以与第一实施方式相同或不同，抗体或抗原结合片段不阻断CCL1诱导的G蛋白依赖性钙信号传导。

[1069] 方面12-无和/或低内化CCR8抗体

[1070] 抗CCR8抗体可以是非内化、低内化、中等内化或高内化抗体或抗原结合片段。

[1071] 根据第十二方面，其可以与第六、第七、第八、第九、第十和/或第十一方面相同或不同，提供了一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体或抗原结合片段是非内化或低内化抗体或抗原结合片段。

[1072] 取决于抗体、片段或缀合物的特定作用模式，可能需要或必须避免内化到细胞中，如本文别处所讨论的。第12方面的抗体特别适用于ADCC/ADCP方法，或依赖抗体或抗原结合片段募集效应细胞的任何其他作用模式。

[1073] 因为过度表达可能影响内化行为并且不太适合在治疗环境中模拟内化，所以内化优选地使用具有靶标内源表达的模型细胞系来确定。当靶标是人CCR8时，内源性表达靶标的细胞优选是HuT78。当靶标是鼠CCR8时，内源性表达靶标的细胞优选是鼠BW5147.3。HuT78和mBW5147.3可以从ATCC获得。

[1074] 虽然所有现有技术的抗体都容易内化到具有内源靶标表达的细胞中，如实施例10.5所示，但测试的抗体TPP-21360、TPP-21047(数据未显示)和TPP-23411以及根据本发明的各种其他抗体没有显著地内化。

[1075] 例如，可以在一个时间范围内或针对特定时间点确定内化。优选地，可以在内源性表达靶标的细胞中在15分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、6小时、12小时、24小时或48小时

后测定内化。

[1076] 根据第十二个方面的一些第一实施方式，抗体或抗原结合片段的特征在于以低于同种型对照地内化的1.5、2、3、4、5、6、7或10倍内化到具有内源靶标表达的细胞中。可以如本领域已知的那样选择抗体的同种型对照以尽可能接近地匹配抗体的同种型，但不结合靶标。

[1077] 根据这些实施方式中的一些，抗体或抗原结合片段的特征在于以低于同种型对照的内化的150％、175％、200％、300％、400％或500％内化到具有内源靶标表达的细胞中，例如15分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、6小时、12小时、24小时或48小时后，优选地，其中具有内源靶标表达的细胞是HuT78淋巴瘤细胞。

[1078] 根据这些实施方式的一些优选的实施方式，抗体或抗原结合片段具有与同种型对照的内化率处于相同数量级的内化率。

[1079] 根据第十二方面的一些第二实施方式，其可与第一实施方式相同或不同，抗体或抗原结合片段特异性结合人CCR8并且其特征在于在内源性表达靶标地细胞中，直到抗体、片段或缀合物的量的一半已被内化的时间＞2小时，优选地＞4、＞5、＞6、＞7、＞8、＞9、＞10、＞11、＞12、＞13、＞14、＞15、＞16，＞17、＞18、＞19、＞20、＞21、＞22、＞23、＞24、＞26、＞28、＞30或＞48小时，或者无法完全确定这样的时间，优选地，其中内源性表达靶标的细胞是HuT78淋巴瘤细胞。例如，抗CCR8抗体的内化率低于抗体433H和L263G8(BioLegend Cat.No.360602)。

[1080] 根据第十二方面的一些第三实施方式，其可以与第一或第二实施方式相同或不同，抗体或抗原结合片段特异性结合鼠CCR8并且在内源性表达靶标的细胞中具有比抗体SA214G2更低的内化率，优选地，其中内源性表达靶标的细胞是鼠淋巴瘤细胞系BW5147.3。

[1081] 所提供的分离的抗体或抗原结合片段还优选地是根据方面7、8、9、10、11、13、14、15、16、17或18中任一方面或其组合的抗体。

[1082] 方面13-ADCC/ADCP诱导CCR8抗体

[1083] 为了诱导CCR8表达细胞(如激活的Tregs)的杀伤，可以设想多种作用模式。一种作用模式是将靶向CCR8的抗体与药物缀合成抗体药物缀合物(ADC)的形式。其他可能的作用模式是ADCC、CDC和ADCP。对于ADCC、CDC和ADCP，涉及两步机制：一方面，需要抗体或片段有效结合靶细胞，例如，通过CCR8的Treg，另一方面，抗体的FC部分(或可以与抗体或片段缀合的替代结合部分，如本文其他地方所述)必须结合效应细胞，然后介导靶细胞的杀伤。对于ADCP，结合作为效应细胞的巨噬细胞通常通过抗体FC部分与巨噬细胞表达的FcγRIIa(CD32a)的相互作用发生。相反，ADCC是通过抗体或片段与FcγRIIIa的相互作用介导的。在人类中，FcγRIII以两种不同的形式存在：FcγRIIIa(CD16a)和FcγRIIIb(CD16b)。FcγRIIIa作为跨膜受体在肥大细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞上表达，而FcγRIIIb仅在中性粒细胞上表达。这些受体与IgG抗体的Fc部分结合，然后激活由人效应细胞介导的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[1084] 如有疑问，在分析ADCC和/或ADCP诱导时，需要至少80％，优选地至少85％的靶细胞显示CCR8表达。

[1085] 根据第13方面，其可与第六、第七、第八、第九、第十、第十一和/或第十二方面可以相同或不同，提供了一种特异性结合至CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体或

抗原结合片段诱导ADCC和/或ADCP。

[1086] 例如,提供了特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或抗原结合片段是非岩藻糖基化的并且a)通过人效应细胞例如人NK细胞在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),和b)通过人效应细胞例如人巨噬细胞在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP),优选地,其中最大的ADCC和ADCP诱导的表达人CCR8的靶细胞的体外耗竭至少为30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。如有疑问,应使用至少85%的细胞表达CCR8的靶细胞来确定ADCC和ADCP。

[1087] 在第十三方面的一些优选实施方式中,抗体或抗原结合片段是非岩藻糖基化的。非岩藻糖基化抗体是经过工程化的抗体,使得抗体Fc区中的寡糖不含任何岩藻糖单元。非岩藻糖基化抗体可以如本领域已知的那样获得,例如如实施例10.3中所述。实施例10.3.2证明了本发明抗体的非岩藻糖基化形式与FcγRIIIa的结合得到改善。与FcγRIIa的结合同样略有改善。无岩藻糖基化还增加了与食蟹猴FcγRIII的结合,参见表10.3.2.1。

[1088] ADCC

[1089] 在第13方面的一些第一实施方案A中,抗体或抗原结合片段以低于530nM、500nM、450nM、400nM、300nM或200nM的解离常数(KD)结合人Fcγ受体IIIA变体V176(CD16a)。

[1090] 在第13方面的一些第一实施方式B中,其可以与第一实施方式A相同或不同,抗体或抗原结合片段通过人效应细胞例如人NK细胞在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。可以用本领域已知的测定分析ADCC诱导,例如根据实施例10.3.3ff所述。

[1091] 在第13方面的一些第一实施方式C中,其可与第一实施方式A或B相同或不同,ADCC诱导的激活的人调节性T细胞的最大耗竭至少为25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%,优选地其中至少85%的激活的人调节性T细胞具有CCR8表达,参见表10.3.3.1.2和表10.3.3.1.3。

[1092] 在第13方面的一些第一实施方式D中,其可与第一实施方式A、B或C相同或不同,ADCC诱导的激活人调节性T细胞耗竭的EC50低于500pM、400pM、300pM、200pM、100pM、50pM、25pM、20pM、12.5pM、10pM、5pM或2.5pM。优选地,至少85%的激活的人调节性T细胞具有CCR8表达。

[1093] ADCP

[1094] 在第13方面的一些第二实施方式A中,其可与第一实施方式A、B、C和/或D相同或不同,抗体或抗原结合片段以解离常数(KD)低于30μM、20μM、10μM、5μM或1μM结合人FcγRIIA。

[1095] 在第13方面的一些第二实施方式B中,其可与第一实施方式A、B、C和/或D相同,并且可与第二实施方式A相同,抗体或抗原结合片段通过人效应细胞例如人巨噬细胞在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)。例如,人巨噬细胞可以是M2c或M1巨噬细胞。

[1096] 在第13方面的一些第二实施方式C中,其可与第一实施方式A、B、C和/或D相同,并且可与第二实施方式A和/或B相同,ADCP诱导的激活的人调节性T细胞的最大耗竭至少为5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%或50%。

[1097] 在第13方面的一些第二实施方式D中,其可与第一实施方式A、B、C和/或D相同,并

且可与第二实施方式A、B和/或C相同，ADCP诱导的激活的人调节性T细胞的诱导耗竭低于1500pM、1000pM、500pM、250pM、200pM、150pM、100pM、75pM、50pM、25pM或10pM。

[1098] 在一些优选的实施方式中，提供了特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体或抗原结合片段

[1099] a)以低于530nM、500nM、450nM、400nM、300nM或200nM的解离常数(KD)结合人Fcγ受体IIIA变体V176(CD16a)，和/或

[1100] b)以低于30μM、20μM、10μM、5μM或1μM的解离常数(KD)结合人FcγRIIA(CD32a)。

[1101] 在一些优选的实施方式中，提供了特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体或抗原结合片段

[1102] a)通过人效应细胞(例如人NK细胞)在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)，和/或

[1103] b)通过人效应细胞(如人巨噬细胞)在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)。

[1104] 在一些优选的实施方式中，提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段，其特异性结合CCR8，其中

[1105] a)ADCC诱导的激活人调节性T细胞的最大耗竭至少为30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、98％或99％，和/或

[1106] b)ADCP诱导的激活人调节性T细胞的最大耗竭至少为5％、10％、15％、20％、25％、30％、40％或50％，和/或

[1107] c)体外或受试者体内肿瘤内调节性T细胞的最大耗竭至少为50％、60％、70％、80％、90％、95％或99％。

[1108] 在一些优选的实施方式中，提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段，其特异性结合CCR8，其中

[1109] a)ADCC诱导的激活的人调节性T细胞的耗竭的EC50低于200pM、100pM、50pM、25pM、12.5pM、10pM或5pM和/或

[1110] b)ADCP诱导的激活的人调节性T细胞耗竭的EC50低于500pM、250pM、200pM、150pM、100pM、75pM、50pM或25pM。

[1111] 所提供的分离的抗体或抗原结合片段还优选地是根据方面14、15、16、17或18或其组合中任一方面的抗体。

[1112] 方面14-TREG调节性CCR8抗体

[1113] 根据本发明的抗体的体内治疗效果显示在实施例12ff。抗体调节若干免疫细胞群的绝对和相对数量的能力是通过靶结合特性和FC受体相互作用的组合在结构上实现的，例如如根据第7、第10、第12和/或第13方面或其组合所描述的。

[1114] 根据第十四方面，其可与第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二和/或第十三方面相同或不同，提供了一种特异性结合CCR8分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体或抗原结合片段耗尽激活的调节性T细胞，优选地肿瘤内Treg。实施例12.1.1显示了在各种小鼠模型中用本发明的抗体获得的高水平的T reg消耗，其中替代抗体的特征在于与提供的抗人CCR8抗体相当的功能特征。有趣的是，在Treg耗竭至少50％的那些例子中观察到更好的治疗反应。Treg耗竭可在体外或体内测量。如本领域技术人员所理解的，Treg耗尽可以

是暂时耗尽。例如,可以在治疗后24、48或72小时分析Treg耗竭。

[1115] 根据第14方面的一些第一实施方式,抗体或抗原结合片段的有效剂量的特征在于体外或受试者中激活或肿瘤内调节性T细胞的最大耗竭至少45%,50%、55%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。

[1116] 可以如本领域已知的那样进行体外或体内测定。体内测定可如实施例12 ff所述进行。合适的受试者包括例如人和非人,例如小鼠(例如CT26模型或EMT-6模型)、啮齿动物或食蟹猴。

[1117] 根据第14方面的一些第二实施方式,其可与第一实施方式相同或不同,抗体或抗原结合片段的有效剂量在体外或在受试者中减少激活的或肿瘤内调节性T细胞的数量至低于55%、50%、40%、30%、25%、20%、10%、5%或1%。减少可是暂时的减少。例如,不受理论的束缚,随后可以补充肿瘤内Tregs库。

[1118] 根据第14方面的一些第三实施方式,其可与第一和/或第二实施方式相同或不同,有效剂量的抗体或抗原结合片段在体外或受试者中增加肿瘤内CD8+ T细胞与肿瘤内Tregs的比率至至少5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或更高。增加可是暂时的增加。

[1119] 根据第十四方面的一些第四实施方式,其可以与第一、第二和/或第三实施方式相同或不同,有效剂量的抗体或抗原结合片段在体外或受试者中降低肿瘤内CD4+T细胞中的调节性T细胞的百分比至<30%、<20%、<10%或<5%。减少可是暂时的减少。

[1120] 在优选的实施方式中,有效剂量的抗体或抗原结合片段

[1121] a)在体外或受试者中,将激活或肿瘤内调节性T细胞的数量减少至低于30%、25%、20%、10%、5%或1%和/或

[1122] b)在体外或受试者中,将肿瘤内CD8+T细胞与肿瘤内Tregs的比率增加至至少5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或更高和/或

[1123] c)在体外或受试者中,将肿瘤内CD4+ T细胞中的调节性T细胞的百分比降低至<30%、<20%、<10%或<5%。

[1124] 根据当前方面的抗体在治疗功效方面是优越的,参见实施例12 ff。所提供的分离的抗体或抗原结合片段还优选地是根据方面15、16、17或18中任一项或其组合的抗体。

[1125] 方面15-免疫细胞调节CCR8抗体

[1126] 根据第十五方面,其可以与第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三和/或第十四方面相同或不同,提供了一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段,其中有效剂量的抗体或抗原结合片段增加了确定的肿瘤体积中免疫细胞的绝对数量,例如至少1.5、2、2.5、3、3.5或4倍。

[1127] 实施例12.8显示在研究结束时来自不同受试者的反应性肿瘤中各种全局或特定免疫细胞标志物的mRNA表达水平大量增加。观察到增加,例如对于巨噬细胞(特别是M1巨噬细胞)、CD8+ T细胞、NK细胞、CD3+ T细胞、B细胞,有趣的是激活的Treg,表明这些免疫细胞群在长期治疗后在肿瘤内的浸润增加。绝对免疫细胞数量的增加也由FACS证实,参见实施例12.3(CT26)、实施例12.4(EMT6)、实施例12.5(F9)。合适的受试者包括例如人类和非人类受试者,例如小鼠、啮齿动物或食蟹猴。例如,可以在一剂、两剂、三剂或四剂有效剂量的抗体后,参见实施例12.3、12.4.2以及慢性治疗后,例如最后的治疗后测定免疫细胞的增加。

例如,肿瘤可以是以肿瘤浸润淋巴细胞为特征的肿瘤,例如淋巴细胞。以肿瘤浸润性T细胞为特征的肿瘤或以促炎细胞因子的表达为特征的肿瘤。

[1128] 根据第十五方面的一些第一实施方式,免疫细胞至少是选自以下的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个或九个:

[1129] a)(肿瘤内)CD45+细胞,

[1130] b)(肿瘤内)CD8+ T细胞,

[1131] c)(肿瘤内)CD4+ T细胞,

[1132] d)(瘤内)巨噬细胞,例如M1巨噬细胞或M2巨噬细胞,

[1133] e)(肿瘤内)NK细胞,

[1134] f)(肿瘤内)B细胞,

[1135] g)(肿瘤内)树突状细胞,

[1136] h)(肿瘤内)γδT细胞(非常规T细胞),和

[1137] i)iNKT细胞。

[1138] 各自的细胞类型和群体被定义为本领域已知的,并且特别是如本文别处所定义的。

[1139] 根据这些第一实施方式的一些高度优选实施方式,在肿瘤中三剂或更多有效剂量的抗体或抗原结合片段增加

[1140] a)肿瘤内CD8+ T细胞的数量至至少150%、200%、250%、300%或350%,

[1141] b)肿瘤内CD8+ T细胞与肿瘤内调节性T细胞的比率至至少4、5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、或更高,

[1142] c)肿瘤内巨噬细胞的数量至至少2、3、4或5倍,

[1143] d)肿瘤内ACOD1+巨噬细胞(M1巨噬细胞)的数量至少2、3、4、5、6、7、8、9或10倍,

[1144] e)ACOD1+巨噬细胞(M1巨噬细胞)与MRC1+巨噬细胞(M2巨噬细胞)的比率至至少1.5、2、3、4、5、10或更高,

[1145] f)肿瘤内NK细胞的数量至至少达到140%或200%,

[1146] g)肿瘤内CD3+ T细胞的数量至至少150%、200%、300%或400%,

[1147] h)肿瘤内B细胞的数量至少2、5、10、20、30或40倍,

[1148] i)肿瘤内CD45+ T细胞的数量至至少150%、200%或300%,和/或

[1149] j)肿瘤内CD4+ T细胞的数量至至少150%、200%、300%或400%。

[1150] 肿瘤优选地是以肿瘤浸润淋巴细胞为特征的肿瘤。如技术人员所理解的,肿瘤的特征在于表达本发明抗体或片段的靶CCR8的细胞,例如肿瘤内Tregs。优选地,肿瘤是源自BALB/c株的同基因肿瘤模型中的肿瘤。例如,如实施例12.1.1所示,肿瘤可来源于CT26模型、EMT-6模型、F9模型、C38、H22或B16F10-OVA模型,其中抗体特异性结合鼠CCR8。例如,当抗体特异性结合人CCR8时,肿瘤可以选自肾上腺癌(例如肾上腺皮质癌或嗜铬细胞瘤)、膀胱癌(例如移行细胞癌、移行细胞癌-乳头状)、脑癌(例如神经胶质瘤-星形细胞瘤、神经胶质瘤-星形细胞瘤-胶质母细胞瘤、神经胶质瘤-少突星形细胞瘤、神经胶质瘤-少突胶质细胞瘤)、乳腺癌(例如ADC、ADC-导管、ADC-导管-TNBC、ADC-导管-TPBC、ADC-小叶)、结直肠癌(例如ADC)、食道癌(例如ADC)、食道癌(例如SCC)、胃癌(例如ADC、ADC-弥漫性、ADC-肠型、ADC-肠-管状)、头颈癌(例如喉癌-SCC、SCC、口腔癌-SCC)、肾癌(例如ccRCC、Chromophobe、

乳头状、乳头状I型、乳头状II型)、肝癌(例如HCC)、肺癌(例如NSCLC-ADC、NSCLC-ADC-混合型、NSCLC-SCC、SCLC)、间皮瘤(例如上皮样)、卵巢癌(例如ADC-囊腺癌-浆液性乳头状癌)、胰腺癌(例如ADC-导管)、前列腺癌(例如ADC-腺泡型)、肉瘤(例如平滑肌肉瘤、去分化脂肪肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤)、皮肤癌(例如黑色素瘤)、睾丸癌(例如生殖细胞瘤-精原细胞瘤)、胸腺瘤、甲状腺癌(例如滤泡性癌、乳头状癌-经典变体)、子宫癌(例如宫颈-SCC、宫颈-SCC-角化、宫颈-SCC-非角化、子宫内膜-ADC-子宫内膜样、子宫内膜-ADC-乳头状浆液性、子宫内膜-癌肉瘤-恶性苗勒管混合瘤),参见表11.1.2。

[1151] 在这些实施方式的一些中,免疫细胞是

[1152] a)CD8+ T细胞、CD4+ T细胞和巨噬细胞,

[1153] b)CD8+ T细胞、CD4+ T细胞、NK细胞,

[1154] c)CD8+ T细胞、CD4+ T细胞、CD45+细胞,

[1155] d)CD8+ T细胞、CD4+ T细胞、NK细胞和巨噬细胞,

[1156] e)CD8+ T细胞、CD4+ T细胞、NK细胞和巨噬细胞,例如ACOD1+巨噬细胞,

[1157] f)CD8+ T细胞、CD4+ T细胞、NK细胞、CD45+细胞,

[1158] g)CD8+ T细胞、CD4+ T细胞、NK细胞、CD45+细胞和巨噬细胞,例如ACOD1+巨噬细胞,

[1159] h)CD8+ T细胞、ACOD1+巨噬细胞(M1巨噬细胞)和B细胞,

[1160] i)CD8+ T细胞、CD4+ T细胞和树突细胞,其中树突细胞的特征在于表达CD1c、CD14、CD16、CD141、CD11c和CD123,或

[1161] j)CD8+ T细胞和Acod1+巨噬细胞(M1巨噬细胞)。

[1162] 在这些实施方式中的一些优选实施方式中,免疫细胞是

[1163] a)CD8+ T细胞、CD4+ T细胞和巨噬细胞,或

[1164] b)CD8+ T细胞、CD4+ T细胞、NK细胞和巨噬细胞,或

[1165] c)CD8+ T细胞、ACOD1+巨噬细胞(M1巨噬细胞)和B细胞。

[1166] 根据更进一步的实施方式,免疫细胞是CD45+细胞和CD8+T细胞、CD45+细胞和CD4+T细胞、CD45+细胞和巨噬细胞(如M1巨噬细胞或M2巨噬细胞)、CD45+细胞和NK细胞、CD45+细胞和B细胞,CD45+细胞和树突状细胞、CD45+细胞和γδT细胞、CD45+细胞和iNKT细胞、CD8+T细胞和CD4+ T细胞、CD8+ T细胞和巨噬细胞(如M1巨噬细胞或M2巨噬细胞)、CD8+ T细胞和NK细胞、CD8+ T细胞和B细胞、CD8+ T细胞和树突状细胞、CD8+ T细胞和γδT细胞、CD8+ T细胞和iNKT细胞、CD4+ T细胞和巨噬细胞(如M1巨噬细胞或M2巨噬细胞)、CD4+ T细胞和NK细胞、CD4+ T细胞和B细胞、CD4+ T细胞和树突状细胞、CD4+ T细胞和γδT细胞、CD4+ T细胞和iNKT细胞、巨噬细胞(如M1巨噬细胞或M2巨噬细胞)和NK细胞、巨噬细胞(如M1巨噬细胞或M2巨噬细胞)和B细胞、巨噬细胞(如M1巨噬细胞或M2巨噬细胞)和树突状细胞、巨噬细胞(如M1巨噬细胞或M2巨噬细胞)和γδT细胞、巨噬细胞(如M1巨噬细胞或M2巨噬细胞)和iNKT细胞、B细胞和树突状细胞、B细胞和γδT细胞、B细胞和iNKT细胞、树突细胞和γδT细胞、树突细胞和iNKT细胞,或γδT细胞和iNKT细胞。

[1167] 所提供的分离的抗体或抗原结合片段还优选地是根据方面16、17或18或其组合中任一方面的抗体。

[1168] 方面16-CCR8抗体形成三级淋巴结构

[1169] 根据第十六方面，其可以与第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四和/或第十五方面相同或不同，提供了一种特异性结合CCR8分离的抗体或抗原结合其片段，其中抗体或抗原结合片段诱导三级淋巴结构的形成。三级淋巴结构是以LTta、LTtb、Cxcr5及其Cxcl13配体表达增加为特征的肿瘤内结构。三级淋巴结构被描述为人类抗肿瘤作用的关键驱动因素。不受理论的束缚，发明人认为这些亚结构的形成可能有助于改变免疫细胞的模式和本发明抗体的抗肿瘤作用，例如在人中。如实施例12.8中所讨论的，用本发明的抗体长期治疗持续增加了LTta、LTtb以及Cxcr5及其配体Cxcl13的表达水平。

[1170] 序列确定的抗体

[1171] 根据以下两个方面17和18的抗体是用根据方面3或4的方法获得的。根据方面17和18产生的抗体特异性结合包含人趋化因子受体的硫酸化TRD的多肽，例如其中至少50％的酪氨酸残基已被硫酸化。如前所述，该方法影响所获得抗体的HCDR3的特定结构特征，也可能影响功能特征，例如G蛋白非依赖性信号传导或内化行为的调节。

[1172] 在公开了CDR、可变重链、可变轻链、重链或轻链的情况下，抗体的模块化性质通常允许它们组合，而且还允许与各种功能性特征组合，如本文别处所述。

[1173] 方面17-抗人CCR8抗体(序列定义)

[1174] 根据第十七方面，其可以与第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五和/或第十六方面相同或不同，提供了分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段。

[1175] 优选地，根据当前方面的抗体结合(a)根据SEQ ID NO:43和/或SEQ ID NO:46的分离的多肽，其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，和(b)根据SEQ ID NO:44和/或SEQ ID NO:47的分离多肽，其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，和抗体对人和食蟹猴CCR8具有交叉反应性。此外，抗体的特征优选地在于使它们特别适用于治疗的特性，例如根据方面7、8、9、10、11、12、13、14、15或16中至少一个或多个方面的抗体。

[1176] 根据一些优选的实施方式，分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段包含至少一个、两个、优选地三个、四个、五个或六个CDR序列，其与以下任一序列具有至少90％、95％、98％或100％序列同一性

[1177] a)SEQ ID NO:258,SEQ ID NO:259,SEQ ID NO:260,SEQ ID NO:262,SEQ ID NO:263or SEQ ID NO:264(TPP-16966)，

[1178] b)SEQ ID NO:276,SEQ ID NO:277,SEQ ID NO:278,SEQ ID NO:280,SEQ ID NO:281or SEQ ID NO:282(TPP-17575)，

[1179] c)SEQ ID NO:294,SEQ ID NO:295,SEQ ID NO:296,SEQ ID NO:298,SEQ ID NO:299or SEQ ID NO:300(TPP_17576)，

[1180] d)SEQ ID NO:312,SEQ ID NO:313,SEQ ID NO:314,SEQ ID NO:316,SEQ ID NO:317or SEQ ID NO:318(TPP-17577)，

[1181] e)SEQ ID NO:330,SEQ ID NO:331,SEQ ID NO:332,SEQ ID NO:334,SEQ ID NO:335 or SEQ ID NO:336(TPP-17578)，

[1182] f)SEQ ID NO:348,SEQ ID NO:349,SEQ ID NO:350,SEQ ID NO:352,SEQ ID NO:353 or SEQ ID NO:354(TPP-17579)，

[1183] g)SEQ ID NO:366,SEQ ID NO:367,SEQ ID NO:368,SEQ ID NO:370,SEQ ID NO:

371 or SEQ ID NO:372(TPP-17580),

[1184] h)SEQ ID NO:384,SEQ ID NO:385,SEQ ID NO:386,SEQ ID NO:388,SEQ ID NO:389 or SEQ ID NO:390(TPP-17581),

[1185] i)SEQ ID NO:402,SEQ ID NO:403,SEQ ID NO:404,SEQ ID NO:406,SEQ ID NO:407 or SEQ ID NO:408(TPP-18205),

[1186] j)SEQ ID NO:420,SEQ ID NO:421,SEQ ID NO:422,SEQ ID NO:424,SEQ ID NO:425 or SEQ ID NO:426(TPP-18206),

[1187] k)SEQ ID NO:438,SEQ ID NO:439,SEQ ID NO:440,SEQ ID NO:442,SEQ ID NO:443 or SEQ ID NO:444(TPP-18207),

[1188] l)SEQ ID NO:456,SEQ ID NO:457,SEQ ID NO:458,SEQ ID NO:460,SEQ ID NO:461 or SEQ ID NO:462(TPP-19546),

[1189] m)SEQ ID NO:474,SEQ ID NO:475,SEQ ID NO:476,SEQ ID NO:478,SEQ ID NO:479 or SEQ ID NO:480(TPP-20950),

[1190] n)SEQ ID NO:492,SEQ ID NO:493,SEQ ID NO:494,SEQ ID NO:496,SEQ ID NO:497 or SEQ ID NO:498(TPP-20955),

[1191] o)SEQ ID NO:510,SEQ ID NO:511,SEQ ID NO:512,SEQ ID NO:514,SEQ ID NO:515,or SEQ ID NO:516(TPP-20965),

[1192] p)SEQ ID NO:528,SEQ ID NO:529,SEQ ID NO:530,SEQ ID NO:532,SEQ ID NO:533 or SEQ ID NO:534(TPP-21045),

[1193] q)SEQ ID NO:546,SEQ ID NO:547,SEQ ID NO:548,SEQ ID NO:550,SEQ ID NO:551 or SEQ ID NO:552(TPP-21047),

[1194] r)SEQ ID NO:564,SEQ ID NO:565,SEQ ID NO:566,SEQ ID NO:568,SEQ ID NO:569 or SEQ ID NO:570(TPP-21181),

[1195] s)SEQ ID NO:582,SEQ ID NO:583,SEQ ID NO:584,SEQ ID NO:586,SEQ ID NO:587 or SEQ ID NO:588(TPP-21183),

[1196] t)SEQ ID NO:600,SEQ ID NO:601,SEQ ID NO:602,SEQ ID NO:604,SEQ ID NO:605 or SEQ ID NO:606(TPP-21360),

[1197] u)SEQ ID NO:618,SEQ ID NO:619,SEQ ID NO:620,SEQ ID NO:622,SEQ ID NO:623 or SEQ ID NO:624(TPP-23411),

[1198] v)SEQ ID NO:661,SEQ ID NO:662,SEQ ID NO:663,SEQ ID NO:665,SEQ ID NO:666 or SEQ ID NO:667(TPP-29596),

[1199] w)SEQ ID NO:681,SEQ ID NO:682,SEQ ID NO:683,SEQ ID NO:685,SEQ ID NO:686 or SEQ ID NO:687(TPP-29597),

[1200] x)SEQ ID NO:703,SEQ ID NO:704,SEQ ID NO:705,SEQ ID NO:707,SEQ ID NO:708 or SEQ ID NO:709(TPP-18429),

[1201] y)SEQ ID NO:723,SEQ ID NO:724,SEQ ID NO:725,SEQ ID NO:727,SEQ ID NO:728 or SEQ ID NO:729(TPP-18430),

[1202] z)SEQ ID NO:743,SEQ ID NO:744,SEQ ID NO:745,SEQ ID NO:747,SEQ ID NO:748 or SEQ ID NO:749(TPP-18432),

[1203] aa)SEQ ID NO:763,SEQ ID NO:764,SEQ ID NO:765,SEQ ID NO:767,SEQ ID NO:768 or SEQ ID NO:769(TPP-18433),

[1204] bb)SEQ ID NO:783,SEQ ID NO:784,SEQ ID NO:785,SEQ ID NO:787,SEQ ID NO:788 or SEQ ID NO:789(TPP-18436),

[1205] cc)SEQ ID NO:803,SEQ ID NO:804,SEQ ID NO:805,SEQ ID NO:807,SEQ ID NO:808 or SEQ ID NO:809(TPP-19571),

[1206] dd)SEQ ID NO:827,SEQ ID NO:828,SEQ ID NO:829,SEQ ID NO:831,SEQ ID NO:832 or SEQ ID NO:833(TPP-27477),

[1207] ee)SEQ ID NO:847,SEQ ID NO:848,SEQ ID NO:849,SEQ ID NO:851,SEQ ID NO:852or SEQ ID NO:853(TPP-27478),

[1208] ff)SEQ ID NO:867,SEQ ID NO:868,SEQ ID NO:869,SEQ ID NO:871,SEQ ID NO:872or SEQ ID NO:873(TPP-27479),

[1209] gg)SEQ ID NO:887,SEQ ID NO:888,SEQ ID NO:889,SEQ ID NO:891,SEQ ID NO:892or SEQ ID NO:893(TPP-27480),

[1210] hh)SEQ ID NO:907,SEQ ID NO:908,SEQ ID NO:909,SEQ ID NO:911,SEQ ID NO:912or SEQ ID NO:913(TPP-29367),

[1211] ii)SEQ ID NO:927,SEQ ID NO:928,SEQ ID NO:929,SEQ ID NO:931,SEQ ID NO:932or SEQ ID NO:933(TPP-29368),

[1212] and/or

[1213] jj)SEQ ID NO:947,SEQ ID NO:948,SEQ ID NO:949,SEQ ID NO:951,SEQ ID NO:952or SEQ ID NO:953(TPP-29369).

[1214] 根据一些优选的实施方式,分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:260(TPP-16966),SEQ ID NO:278(TPP-17575),SEQ ID NO:296(TPP-17576),SEQ ID NO:314(TPP-17577),SEQ ID NO:332(TPP-17578),SEQ ID NO:350(TPP-17579),SEQ ID NO:368(TPP-17580),SEQ ID NO:386(TPP-17581),SEQ ID NO:404(TPP-18205),SEQ ID NO:422(TPP-18206),SEQ ID NO:440(TPP-18207),SEQ ID NO:458(TPP-19546),SEQ ID NO:476(TPP-20950),SEQ ID NO:494(TPP-20955),SEQ ID NO:512(TPP-20965),SEQ ID NO:530(TPP-21045),SEQ ID NO:548(TPP-21047),SEQ ID NO:566(TPP-21181),SEQ ID NO:584(TPP-21183),SEQ ID NO:602(21360),or SEQ ID NO:620(TPP-23411),SEQ ID NO:663(TPP-29596),SEQ ID NO:683(TPP-29597),SEQ ID NO:705(TPP-18429),SEQ ID NO:725(TPP-18430),SEQ ID NO:745(TPP-18432),SEQ ID NO:765(TPP-18433),SEQ ID NO:785(TPP-18436),SEQ ID NO:805(TPP-19571),SEQ ID NO:829(TPP-27477),SEQ ID NO:849(TPP-27478),SEQ ID NO:869(TPP-27479),SEQ ID NO:889(TPP-27480),SEQ ID NO:909(TPP-29367),SEQ ID NO:929(TPP-29368),或SEQ ID NO:949(TPP_29369)的任一具有至少90％、95％、98％或100％序列同一性的HCDR3序列。

[1215] 根据一些优选的实施方式,分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段包含以下的至少一个、两个、优选地三个、四个、五个或六个CDR序列,

[1216] a)SEQ ID NO:258,SEQ ID NO:259,SEQ ID NO:260,SEQ ID NO:262,SEQ ID NO:263 and SEQ ID NO:264(TPP-16966),

[1217] b)SEQ ID NO:276,SEQ ID NO:277,SEQ ID NO:278,SEQ ID NO:280,SEQ ID NO:281 and SEQ ID NO:282(TPP-17575),

[1218] c)SEQ ID NO:294,SEQ ID NO:295,SEQ ID NO:296,SEQ ID NO:298,SEQ ID NO:299 and SEQ ID NO:300(TPP-17576),

[1219] d)SEQ ID NO:312,SEQ ID NO:313,SEQ ID NO:314,SEQ ID NO:316,SEQ ID NO:317 and SEQ ID NO:318(TPP-17577),

[1220] e)SEQ ID NO:330,SEQ ID NO:331,SEQ ID NO:332,SEQ ID NO:334,SEQ ID NO:335 and SEQ ID NO:336(TPP-17578),

[1221] f)SEQ ID NO:348,SEQ ID NO:349,SEQ ID NO:350,SEQ ID NO:352,SEQ ID NO:353 and SEQ ID NO:354(TPP-17579),

[1222] g)SEQ ID NO:366,SEQ ID NO:367,SEQ ID NO:368,SEQ ID NO:370,SEQ ID NO:371 and SEQ ID NO:372(TPP-17580),

[1223] h)SEQ ID NO:384,SEQ ID NO:385,SEQ ID NO:386,SEQ ID NO:388,SEQ ID NO:389 and SEQ ID NO:390(TPP-17581),

[1224] i)SEQ ID NO:402,SEQ ID NO:403,SEQ ID NO:404,SEQ ID NO:406,SEQ ID NO:407 and SEQ ID NO:408(TPP-18205),

[1225] j)SEQ ID NO:420,SEQ ID NO:421,SEQ ID NO:422,SEQ ID NO:424,SEQ ID NO:425 and SEQ ID NO:426(TPP-18206),

[1226] k)SEQ ID NO:438,SEQ ID NO:439,SEQ ID NO:440,SEQ ID NO:442,SEQ ID NO:443 and SEQ ID NO:444(TPP-18207),

[1227] l)SEQ ID NO:456,SEQ ID NO:457,SEQ ID NO:458,SEQ ID NO:460,SEQ ID NO:461 and SEQ ID NO:462(TPP-19546),

[1228] m)SEQ ID NO:474,SEQ ID NO:475,SEQ ID NO:476,SEQ ID NO:478,SEQ ID NO:479 and SEQ ID NO:480(TPP-20950),

[1229] n)SEQ ID NO:492,SEQ ID NO:493,SEQ ID NO:494,SEQ ID NO:496,SEQ ID NO:497 and SEQ ID NO:498(TPP-20955),

[1230] o)SEQ ID NO:510,SEQ ID NO:511,SEQ ID NO:512,SEQ ID NO:514,SEQ ID NO:515,and SEQ ID NO:516(TPP-20965),

[1231] p)SEQ ID NO:528,SEQ ID NO:529,SEQ ID NO:530,SEQ ID NO:532,SEQ ID NO:533 and SEQ ID NO:534(TPP-21045),

[1232] q)SEQ ID NO:546,SEQ ID NO:547,SEQ ID NO:548,SEQ ID NO:550,SEQ ID NO:551 and SEQ ID NO:552(TPP-21047),

[1233] r)SEQ ID NO:564,SEQ ID NO:565,SEQ ID NO:566,SEQ ID NO:568,SEQ ID NO:569 and SEQ ID NO:570(TPP-21181),

[1234] s)SEQ ID NO:582,SEQ ID NO:583,SEQ ID NO:584,SEQ ID NO:586,SEQ ID NO:587 and SEQ ID NO:588(TPP-21183),

[1235] t)SEQ ID NO:600,SEQ ID NO:601,SEQ ID NO:602,SEQ ID NO:604,SEQ ID NO:605 or SEQ ID NO:606(TPP-21360),

[1236] u)SEQ ID NO:618,SEQ ID NO:619,SEQ ID NO:620,SEQ ID NO:622,SEQ ID NO:

623 or SEQ ID NO:624(TPP-23411),

[1237] v)SEQ ID NO:661,SEQ ID NO:662,SEQ ID NO:663,SEQ ID NO:665,SEQ ID NO:666 or SEQ ID NO:667(TPP-29596),

[1238] w)SEQ ID NO:681,SEQ ID NO:682,SEQ ID NO:683,SEQ ID NO:685,SEQ ID NO:686 or SEQ ID NO:687(TPP-29597),

[1239] x)SEQ ID NO:703,SEQ ID NO:704,SEQ ID NO:705,SEQ ID NO:707,SEQ ID NO:708 or SEQ ID NO:709(TPP-18429),

[1240] y)SEQ ID NO:723,SEQ ID NO:724,SEQ ID NO:725,SEQ ID NO:727,SEQ ID NO:728 or SEQ ID NO:729(TPP-18430),

[1241] z)SEQ ID NO:743,SEQ ID NO:744,SEQ ID NO:745,SEQ ID NO:747,SEQ ID NO:748 or SEQ ID NO:749(TPP-18432),

[1242] aa)SEQ ID NO:763,SEQ ID NO:764,SEQ ID NO:765,SEQ ID NO:767,SEQ ID NO:768 or SEQ ID NO:769(TPP-18433),

[1243] bb)SEQ ID NO:783,SEQ ID NO:784,SEQ ID NO:785,SEQ ID NO:787,SEQ ID NO:788 or SEQ ID NO:789(TPP-18436),

[1244] cc)SEQ ID NO:803,SEQ ID NO:804,SEQ ID NO:805,SEQ ID NO:807,SEQ ID NO:808 or SEQ ID NO:809(TPP-19571),

[1245] dd)SEQ ID NO:827,SEQ ID NO:828,SEQ ID NO:829,SEQ ID NO:831,SEQ ID NO:832 or SEQ ID NO:833(TPP-27477),

[1246] ee)SEQ ID NO:847,SEQ ID NO:848,SEQ ID NO:849,SEQ ID NO:851,SEQ ID NO:852 or SEQ ID NO:853(TPP-27478),

[1247] ff)SEQ ID NO:867,SEQ ID NO:868,SEQ ID NO:869,SEQ ID NO:871,SEQ ID NO:872 or SEQ ID NO:873(TPP-27479),

[1248] gg)SEQ ID NO:887,SEQ ID NO:888,SEQ ID NO:889,SEQ ID NO:891,SEQ ID NO:892 or SEQ ID NO:893(TPP-27480),

[1249] hh)SEQ ID NO:907,SEQ ID NO:908,SEQ ID NO:909,SEQ ID NO:911,SEQ ID NO:912 or SEQ ID NO:913(TPP-29367),

[1250] ii)SEQ ID NO:927,SEQ ID NO:928,SEQ ID NO:929,SEQ ID NO:931,SEQ ID NO:932 or SEQ ID NO:933(TPP-29368),

[1251] and/or

[1252] jj)SEQ ID NO:947,SEQ ID NO:948,SEQ ID NO:949,SEQ ID NO:951,SEQ ID NO:952 or SEQ ID NO:953(TPP-29369),

[1253] 任选地,至多一个、两个、三个、四个或五个突变已被引入至少一个CDR。优选地,HCDR3包含或已被工程化以包含至少一个或多个如别处所述的组氨酸残基。

[1254] 例如,酪氨酸可以与带正电荷的氨基酸如组氨酸交换,反之亦然。例如,带正电荷的氨基酸可以与不同的带正电荷的氨基酸交换,带负电荷的氨基酸可以与不同的带负电荷的氨基酸交换,极性氨基酸可以与不同的极性氨基酸交换,极性不带电氨基酸可以与不同极性不带电氨基酸交换,小氨基酸可以与不同小氨基酸交换,两性氨基酸可以与不同两性氨基酸交换,芳香族氨基酸可与具有不同的芳香族氨基酸交换。如技术人员所理解的,具体

的不改变抗体与CCR8的硫酸化TRD之间的特异性相互作用的氨基酸交换是可能的。

[1255] 根据一些优选的实施方式,分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段包含与以下具有至少90%、95%、98%或100%序列同一性的可变重链序列和/或可变轻链序列

[1256] a)根据SEQ ID NO:257的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:261的可变轻链序列(TPP-16966),

[1257] b)根据SEQ ID NO:275的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:279的可变轻链序列(TPP-17575),

[1258] c)根据SEQ ID NO:293的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:297的可变轻链序列(TPP-17576),

[1259] d)根据SEQ ID NO:311的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:315的可变轻链序列(TPP-17577),

[1260] e)根据SEQ ID NO:329的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:333的可变轻链序列(TPP-17578),

[1261] f)根据SEQ ID NO:347的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:351的可变轻链序列(TPP-17579),

[1262] g)根据SEQ ID NO:365的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:369的可变轻链序列(TPP-17580),

[1263] h)根据SEQ ID NO:383的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:387的可变轻链序列(TPP-17581),

[1264] i)根据SEQ ID NO:401的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:405的可变轻链序列(TPP-18205),

[1265] j)根据SEQ ID NO:419的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:423的可变轻链序列(TPP-18206),

[1266] k)根据SEQ ID NO:437的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:441的可变轻链序列(TPP-18207),

[1267] l)根据SEQ ID NO:455的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:459的可变轻链序列(TPP-19546),

[1268] m)根据SEQ ID NO:473的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:477的可变轻链序列(TPP-20950),

[1269] n)根据SEQ ID NO:491的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:495的可变轻链序列(TPP-20955),

[1270] o)根据SEQ ID NO:509的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:513的可变轻链序列(TPP-20965),

[1271] p)根据SEQ ID NO:527的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:531的可变轻链序列(TPP-21045),

[1272] q)根据SEQ ID NO:545的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:549的可变轻链序列(TPP-21047),

[1273] r)根据SEQ ID NO:563的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:567的可变轻链序列(TPP-21181),

[1274] s)根据SEQ ID NO:581的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:585的可变轻链序列(TPP-21183)，

[1275] t)根据SEQ ID NO:599的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:603的可变轻链序列(TPP-21360)，

[1276] u)根据SEQ ID NO:617的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:621的可变轻链序列(TPP-23411)，

[1277] v)根据SEQ ID NO:660的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:664的可变轻链序列(TPP-29596)，

[1278] w)根据SEQ ID NO:680的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:684的可变轻链序列(TPP-29597)，

[1279] x)根据SEQ ID NO:702的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:706的可变轻链序列(TPP-18429)，

[1280] y)根据SEQ ID NO:722的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:726的可变轻链序列(TPP-18430)，

[1281] z)根据SEQ ID NO:742的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:746的可变轻链序列(TPP-18432)，

[1282] aa)根据SEQ ID NO:762的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:766的可变轻链序列(TPP-18433)，

[1283] bb)根据SEQ ID NO:782的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:786的可变轻链序列(TPP-18436)，

[1284] cc)根据SEQ ID NO:802的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:806的可变轻链序列(TPP-19571)，

[1285] dd)根据SEQ ID NO:826的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:830的可变轻链序列(TPP-27477)，

[1286] ee)根据SEQ ID NO:846的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:850的可变轻链序列(TPP-27478)，

[1287] ff)根据SEQ ID NO:866的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:870的可变轻链序列(TPP-27479)，

[1288] gg)根据SEQ ID NO:886的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:890的可变轻链序列(TPP-27480)，

[1289] hh)根据SEQ ID NO:906的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:910的可变轻链序列(TPP-29367)，

[1290] ii)根据SEQ ID NO:926的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:930的可变轻链序列(TPP-29368)，或

[1291] jj)根据SEQ ID NO:946的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:950的可变轻链序列(TPP-29369)。

[1292] 根据一些优选的实施方式，分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段包含

[1293] a)根据SEQ ID NO:257的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:261的可变轻链序列(TPP-16966)，

[1294] b)根据SEQ ID NO:275的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:279的可变轻链序列(TPP-17575)，

[1295] c)根据SEQ ID NO:293的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:297的可变轻链序列(TPP-17576)，

[1296] d)根据SEQ ID NO:311的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:315的可变轻链序列(TPP-17577)，

[1297] e)根据SEQ ID NO:329的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:333的可变轻链序列(TPP-17578)，

[1298] f)根据SEQ ID NO:347的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:351的可变轻链序列(TPP-17579)，

[1299] g)根据SEQ ID NO:365的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:369的可变轻链序列(TPP-17580)，

[1300] h)根据SEQ ID NO:383的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:387的可变轻链序列(TPP-17581)，

[1301] i)根据SEQ ID NO:401的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:405的可变轻链序列(TPP-18205)，

[1302] j)根据SEQ ID NO:419的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:423的可变轻链序列(TPP-18206)，

[1303] k)根据SEQ ID NO:437的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:441的可变轻链序列(TPP-18207)，

[1304] l)根据SEQ ID NO:455的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:459的可变轻链序列(TPP-19546)，

[1305] m)根据SEQ ID NO:473的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:477的可变轻链序列(TPP-20950)，

[1306] n)根据SEQ ID NO:491的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:495的可变轻链序列(TPP-20955)，

[1307] o)根据SEQ ID NO:509的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:513的可变轻链序列(TPP-20965)，

[1308] p)根据SEQ ID NO:527的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:531的可变轻链序列(TPP-21045)，

[1309] q)根据SEQ ID NO:545的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:549的可变轻链序列(TPP-21047)，

[1310] r)根据SEQ ID NO:563的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:567的可变轻链序列(TPP-21181)，

[1311] s)根据SEQ ID NO:581的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:585的可变轻链序列(TPP-21183)，

[1312] t)根据SEQ ID NO:599的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:603的可变轻链序列(TPP-21360)，

[1313] u)根据SEQ ID NO:617的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:621的可变轻链序列

(TPP-23411)，

[1314] v)根据SEQ ID NO:660的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:664的可变轻链序列(TPP-29596)，

[1315] w)根据SEQ ID NO:680的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:684的可变轻链序列(TPP-29597)，

[1316] x)根据SEQ ID NO:702的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:706的可变轻链序列(TPP-18429)，

[1317] y)根据SEQ ID NO:722的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:726的可变轻链序列(TPP-18430)，

[1318] z)根据SEQ ID NO:742的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:746的可变轻链序列(TPP-18432)，

[1319] aa)根据SEQ ID NO:762的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:766的可变轻链序列(TPP-18433)，

[1320] bb)根据SEQ ID NO:782的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:786的可变轻链序列(TPP-18436)，

[1321] cc)根据SEQ ID NO:802的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:806的可变轻链序列(TPP-19571)，

[1322] dd)根据SEQ ID NO:826的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:830的可变轻链序列(TPP-27477)，

[1323] ee)根据SEQ ID NO:846的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:850的可变轻链序列(TPP-27478)，

[1324] ff)根据SEQ ID NO:866的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:870的可变轻链序列(TPP-27479)，

[1325] gg)根据SEQ ID NO:886的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:890的可变轻链序列(TPP-27480)，

[1326] hh)根据SEQ ID NO:906的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:910的可变轻链序列(TPP-29367)，

[1327] ii)根据SEQ ID NO:926的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:930的可变轻链序列(TPP-29368)，或

[1328] jj)根据SEQ ID NO:946的可变重链序列和/或根据SEQ ID NO:950的可变轻链序列(TPP-29369)。

[1329] 根据一些优选的实施方式，分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段包含与以下序列具有至少90％、95％、98％或100％序列同一性的重链序列和/或轻链序列

[1330] a)根据SEQ ID NO:273的重链和根据SEQ ID NO:274的轻链(TPP-16966)，

[1331] b)根据SEQ ID NO:291的重链和根据SEQ ID NO:292的轻链(TPP-17575)，

[1332] c)根据SEQ ID NO:309的重链和根据SEQ ID NO:310的轻链(TPP-17576)，

[1333] d)根据SEQ ID NO:327的重链和根据SEQ ID NO:328的轻链(TPP-17577)，

[1334] e)根据SEQ ID NO:345的重链和根据SEQ ID NO:346的轻链(TPP-17578)，

[1335] f)根据SEQ ID NO:363的重链和根据SEQ ID NO:364的轻链(TPP-17579)，

[1336] g)根据SEQ ID NO:381的重链和根据SEQ ID NO:382的轻链(TPP-17580)，

[1337] h)根据SEQ ID NO:399的重链和根据SEQ ID NO:400的轻链(TPP-17581)，

[1338] i)根据SEQ ID NO:417的重链和根据SEQ ID NO:418的轻链(TPP-18205)，

[1339] j)根据SEQ ID NO:435的重链和根据SEQ ID NO:436的轻链(TPP-18206)，

[1340] k)根据SEQ ID NO:453的重链和根据SEQ ID NO:454的轻链(TPP-18207)，

[1341] l)根据SEQ ID NO:471的重链和根据SEQ ID NO:472的轻链(TPP-19546)，

[1342] m)根据SEQ ID NO:489的重链和根据SEQ ID NO:490的轻链(TPP-20950)，

[1343] n)根据SEQ ID NO:507的重链和根据SEQ ID NO:508的轻链(TPP-20955)，

[1344] o)根据SEQ ID NO:525的重链和根据SEQ ID NO:526的轻链(TPP-20965)，

[1345] p)根据SEQ ID NO:543的重链和根据SEQ ID NO:544的轻链(TPP-21045)，

[1346] q)根据SEQ ID NO:561的重链和根据SEQ ID NO:562的轻链(TPP-21047)，

[1347] r)根据SEQ ID NO:579的重链和根据SEQ ID NO:580的轻链(TPP-21181)，

[1348] s)根据SEQ ID NO:597的重链和根据SEQ ID NO:598的轻链(TPP-21183)，

[1349] t)根据SEQ ID NO:615的重链和根据SEQ ID NO:616的轻链(TPP-21360)，

[1350] u)根据SEQ ID NO:633的重链和根据SEQ ID NO:634的轻链(TPP-23411)，

[1351] v)根据SEQ ID NO:676的重链和根据SEQ ID NO:677的轻链(TPP-29596)，

[1352] w)根据SEQ ID NO:696的重链和根据SEQ ID NO:697的轻链(TPP-29597)，

[1353] x)根据SEQ ID NO:718的重链和根据SEQ ID NO:719的轻链(TPP-18429)，

[1354] y)根据SEQ ID NO:738的重链和根据SEQ ID NO:739的轻链(TPP-18430)，

[1355] z)根据SEQ ID NO:758的重链和根据SEQ ID NO:759的轻链(TPP-18432)，

[1356] aa)根据SEQ ID NO:778的重链和根据SEQ ID NO:779的轻链(TPP-18433)，

[1357] bb)根据SEQ ID NO:798的重链和根据SEQ ID NO:799的轻链(TPP-18436)，

[1358] cc)根据SEQ ID NO:818的重链和根据SEQ ID NO:819的轻链(TPP-19571)，

[1359] dd)根据SEQ ID NO:842的重链和根据SEQ ID NO:843的轻链(TPP-27477)，

[1360] ee)根据SEQ ID NO:862的重链和根据SEQ ID NO:863的轻链(TPP-27478)，

[1361] ff)根据SEQ ID NO:882的重链和根据SEQ ID NO:883的轻链(TPP-27479)，

[1362] gg)根据SEQ ID NO:902的重链和根据SEQ ID NO:903的轻链(TPP-27480)，

[1363] hh)根据SEQ ID NO:922的重链和根据SEQ ID NO:923的轻链(TPP-29367)，

[1364] ii)根据SEQ ID NO:942的重链和根据SEQ ID NO:943的轻链(TPP-29368)，或

[1365] jj)根据SEQ ID NO:962的重链和根据SEQ ID NO:963的轻链(TPP-29369)。

[1366] 根据一些优选的实施方式，分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段包含

[1367] a)根据SEQ ID NO:273的重链和根据SEQ ID NO:274的轻链(TPP-16966)，

[1368] b)根据SEQ ID NO:291的重链和根据SEQ ID NO:292的轻链(TPP-17575)，

[1369] c)根据SEQ ID NO:309的重链和根据SEQ ID NO:310的轻链(TPP-17576)，

[1370] d)根据SEQ ID NO:327的重链和根据SEQ ID NO:328的轻链(TPP-17577)，

[1371] e)根据SEQ ID NO:345的重链和根据SEQ ID NO:346的轻链(TPP-17578)，

[1372] f)根据SEQ ID NO:363的重链和根据SEQ ID NO:364的轻链(TPP-17579)，

[1373] g)根据SEQ ID NO:381的重链和根据SEQ ID NO:382的轻链(TPP-17580)，

[1374] h)根据SEQ ID NO:399的重链和根据SEQ ID NO:400的轻链(TPP-17581)，

[1375] i)根据SEQ ID NO:417的重链和根据SEQ ID NO:418的轻链(TPP-18205)，

[1376] j)根据SEQ ID NO:435的重链和根据SEQ ID NO:436的轻链(TPP-18206)，

[1377] k)根据SEQ ID NO:453的重链和根据SEQ ID NO:454的轻链(TPP-18207)，

[1378] l)根据SEQ ID NO:471的重链和根据SEQ ID NO:472的轻链(TPP-19546)，

[1379] m)根据SEQ ID NO:489的重链和根据SEQ ID NO:490的轻链(TPP-20950)，

[1380] n)根据SEQ ID NO:507的重链和根据SEQ ID NO:508的轻链(TPP-20955)，

[1381] o)根据SEQ ID NO:525的重链和根据SEQ ID NO:526的轻链(TPP-20965)，

[1382] p)根据SEQ ID NO:543的重链和根据SEQ ID NO:544的轻链(TPP-21045)，

[1383] q)根据SEQ ID NO:561的重链和根据SEQ ID NO:562的轻链(TPP-21047)，

[1384] r)根据SEQ ID NO:579的重链和根据SEQ ID NO:580的轻链(TPP-21181)，

[1385] s)根据SEQ ID NO:597的重链和根据SEQ ID NO:598的轻链(TPP-21183)，

[1386] t)根据SEQ ID NO:615的重链和根据SEQ ID NO:616的轻链(TPP-21360)，

[1387] u)根据SEQ ID NO:633的重链和根据SEQ ID NO:634的轻链(TPP-23411)，

[1388] v)根据SEQ ID NO:676的重链和根据SEQ ID NO:677的轻链(TPP-29596)，

[1389] w)根据SEQ ID NO:696的重链和根据SEQ ID NO:697的轻链(TPP-29597)，

[1390] x)根据SEQ ID NO:718的重链和根据SEQ ID NO:719的轻链(TPP-18429)，

[1391] y)根据SEQ ID NO:738的重链和根据SEQ ID NO:739的轻链(TPP-18430)，

[1392] z)根据SEQ ID NO:758的重链和根据SEQ ID NO:759的轻链(TPP-18432)，

[1393] aa)根据SEQ ID NO:778的重链和根据SEQ ID NO:779的轻链(TPP-18433)，

[1394] bb)根据SEQ ID NO:798的重链和根据SEQ ID NO:799的轻链(TPP-18436)，

[1395] cc)根据SEQ ID NO:818的重链和根据SEQ ID NO:819的轻链(TPP-19571)，

[1396] dd)根据SEQ ID NO:842的重链和根据SEQ ID NO:843的轻链(TPP-27477)，

[1397] ee)根据SEQ ID NO:862的重链和根据SEQ ID NO:863的轻链(TPP-27478)，

[1398] ff)根据SEQ ID NO:882的重链和根据SEQ ID NO:883的轻链(TPP-27479)，

[1399] gg)根据SEQ ID NO:902的重链和根据SEQ ID NO:903的轻链(TPP-27480)，

[1400] hh)根据SEQ ID NO:922的重链和根据SEQ ID NO:923的轻链(TPP-29367)，

[1401] ii)根据SEQ ID NO:942的重链和根据SEQ ID NO:943的轻链(TPP-29368)，或

[1402] jj)根据SEQ ID NO:962的重链和根据SEQ ID NO:963的轻链(TPP-29369)。

[1403] 根据当前方面还提供了多种抗体，其包含随序列表提供的抗CCR8抗体的CDR的随机排列。

[1404] 优选地，根据当前方面的抗体或抗原结合片段是无岩藻糖基化的，如本文别处所述。优选地，根据当前方面的抗体或抗原结合片段诱导ADCC和/或ADCP，如本文别处所述。优选地，根据当前方面的抗体或抗原结合片段是非内化或低内化抗体，如本文别处所述。

[1405] 方面18-抗鼠CCR8抗体(序列定义)

[1406] 根据第十八方面，其可以与第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五和/或第十六方面相同或不同，提供了分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段。优选地，根据当前方面的抗体结合鼠CCR8，特别是结合根据SEQ ID NO:45和/或SEQ ID NO:48的分离的多肽，其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化。根据当前方面的抗体的CDRs优选地是人来源的CDRs。此外，抗体的特征在于使它们特别适用于治疗的特性，

例如是根据方面7、8、9、10、11、12、13、14、15或16中至少一个或多个方面的抗体。总之，根据当前方面的抗体可用作识别鼠CCR8的替代抗体并且具有如所讨论的优越的治疗特性，例如在实施例12中。

[1407] 根据一些优选的实施方式，分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个与以下序列具有至少90％、95％、98％或100％序列同一性的CDR序列：

[1408] a)SEQ ID NO:202,SEQ ID NO:203,SEQ ID NO:204,SEQ ID NO:206,SEQ ID NO:207和SEQ ID NO:208(TPP-14095)，

[1409] b)SEQ ID NO:216,SEQ ID NO:217,SEQ ID NO:218,SEQ ID NO:220,SEQ ID NO:221或SEQ ID NO:222(TPP-14099)，

[1410] c)SEQ ID NO:230,SEQ ID NO:231,SEQ ID NO:232,SEQ ID NO:234,SEQ ID NO:235和SEQ ID NO:236(TPP-15285)，或

[1411] d)SEQ ID NO:244,SEQ ID NO:245,SEQ ID NO:246,SEQ ID NO:248,SEQ ID NO:249和SEQ ID NO:250(TPP-15286)。

[1412] 根据一些优选的实施方式，分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:204、SEQ ID NO:218、SEQ ID NO:232或SEQ ID NO:246中的任一具有至少90％、95％、98％或100％序列同一性的HCDR3序列。

[1413] 根据一些优选的实施方式，分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段包含以下的至少一个、两个、优选地三个、四个、五个或六个CDR序列，

[1414] a)SEQ ID NO:202,SEQ ID NO:203,SEQ ID NO:204,SEQ ID NO:206,SEQ ID NO:207和SEQ ID NO:208(TPP-14095)，

[1415] b)SEQ ID NO:216,SEQ ID NO:217,SEQ ID NO:218,SEQ ID NO:220,SEQ ID NO:221或SEQ ID NO:222(TPP-14099)，

[1416] c)SEQ ID NO:230,SEQ ID NO:231,SEQ ID NO:232,SEQ ID NO:234,SEQ ID NO:235和SEQ ID NO:236(TPP-15285),or

[1417] d)SEQ ID NO:244,SEQ ID NO:245,SEQ ID NO:246,SEQ ID NO:248,SEQ ID NO:249和SEQ ID NO:250(TPP-15286)，

[1418] 任选地，至多一个、两个、三个、四个或五个突变已被引入至少一个CDR。

[1419] 例如，酪氨酸可以与带正电荷的氨基酸如组氨酸交换，反之亦然。例如，带正电荷的氨基酸可以与不同的带正电荷的氨基酸交换，带负电荷的氨基酸可以与不同的带负电荷的氨基酸交换，极性氨基酸可以与不同的极性氨基酸交换，极性不带电氨基酸可以与不同极性不带电氨基酸交换，小氨基酸可以与不同小氨基酸交换，两性氨基酸可以与不同两性氨基酸交换，芳香族氨基酸可以与不同的芳香族氨基酸交换。如技术人员所理解的，具体地不改变抗体与CCR8的硫酸化TRD之间的特异性相互作用的那些氨基酸交换是可能的。引入组氨酸的氨基酸交换是优选的。

[1420] 根据一些优选的实施方式，分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段包含与以下具有至少90％、95％、98％或100％序列同一性的可变重链序列和/或可变轻链序列

[1421] a)根据SEQ ID NO:201的可变重链序列和根据SEQ ID NO:205的可变轻链序列(TPP-14095)，

[1422] b)根据SEQ ID NO:215的可变重链序列和根据SEQ ID NO:219的可变轻链序列(TPP-14099),

[1423] c)根据SEQ ID NO:229的可变重链序列和根据SEQ ID NO:233的可变轻链序列(TPP-15285),或

[1424] d)根据SEQ ID NO:243的可变重链序列和根据SEQ ID NO:247的可变轻链序列(TPP-15286)。

[1425] 根据一些优选的实施方式,抗CCR8抗体或其抗原结合片段包含e)根据SEQ ID NO:201的可变重链序列和根据SEQ ID NO:205的可变轻链序列(TPP-14095),

[1426] f)根据SEQ ID NO:215的可变重链序列和根据SEQ ID NO:219的可变轻链序列(TPP-14099),

[1427] g)根据SEQ ID NO:229的可变重链序列和根据SEQ ID NO:233的可变轻链序列(TPP-15285),或

[1428] h)根据SEQ ID NO:243的可变重链序列和根据SEQ ID NO:247的可变轻链序列(TPP-15286)。

[1429] 根据一些优选的实施方式,分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段包含与以下序列具有至少90%、95%、98%或100%序列同一性的重链序列和/或轻链序列

[1430] a)根据SEQ ID NO:211的重链和/或根据SEQ ID NO:212的轻链(TPP-14095),

[1431] b)根据SEQ ID NO:225的重链和/或根据SEQ ID NO:226的轻链(TPP-14099),

[1432] c)根据SEQ ID NO:239的重链和/或根据SEQ ID NO:240的轻链(TPP-15285),或

[1433] d)根据SEQ ID NO:253的重链和/或根据SEQ ID NO:254的轻链(TPP-15286)。

[1434] 根据一些优选的实施方式,分离的抗CCR8抗体或其抗原结合片段包含

[1435] a)根据SEQ ID NO:211的重链和/或根据SEQ ID NO:212的轻链(TPP-14095),

[1436] b)根据SEQ ID NO:225的重链和/或根据SEQ ID NO:226的轻链(TPP-14099),

[1437] c)根据SEQ ID NO:239的重链和/或根据SEQ ID NO:240的轻链(TPP-15285),或

[1438] d)根据SEQ ID NO:253的重链和/或根据SEQ ID NO:254的轻链(TPP-15286)。

[1439] 根据“所有方面”的优选的组合

[1440] 以下是方面6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和18(根据本节的“所有方面”)的特别优选的方面。

[1441] 在所有方面的优选实施方式下,抗体或抗原结合片段、分离的抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8的富含硫酸化酪氨酸的结构域。在所有方面的优选实施方式中,抗体或抗原结合片段的特征在于HCDR3区包含10%至34%的酪氨酸和/或2%至20%的组氨酸。在所有方面的优选实施方式中,抗体或抗原结合片段是非内化的或特征在于以低于同种型对照的内化的1.5、2、3、4、5、6、7、或10倍内化进入具有内源靶标表达的细胞。

[1442] 在所有方面的优选实施方式中,抗体或抗原结合片段包含人(衍生的)CDR。例如,抗体可以是人抗人CCR8抗体。在所有方面的优选实施方式中,抗体或抗原结合片段对来自至少两个物种的CCR8具有交叉反应性,优选选自人、猴、猕猴(食蟹猴)、猕猴(恒河猴)、啮齿动物、小鼠、大鼠、马、牛、猪、狗、猫和骆驼,甚至更优选地选自人、食蟹猴和小鼠。根据这些实施方式地一些最优选的实施方式,抗体或抗原结合片段对人和食蟹猴CCR8具有交叉反应性。

[1443] 在所有方面的优选实施方式中，抗体或抗原结合片段以第一解离常数KD结合来自第一物种的CCR8并以第二解离常数KD结合来自第二物种的CCR8，其中第一和第二解离常数处于同一数量级。

[1444] 在所有方面的优选实施方式中，抗体或抗原结合片段以<5E-8M,<4E-8M,<3E-8M,<2E-8M,<1E-8M,<9E-9M,<8E-9M,<7E-9M,<6E-9M,<5E-9M,<4E-9M,<3E-9M,<2.5E-9M,<2E-9M,<1.5E-9M,<1E-9M,<9E-10M,<8E-10M,<7E-10M,<6E-10M,<5E-10M,<4E-10M,<3E-10M,<2.5E-10M,<2E-10M,<1.5E-10M,<1E-10M,或<9E-11M的KD值结合

[1445] a)根据SEQ ID NO:43和/或SEQ ID NO:46的分离的多肽，其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，和/或

[1446] b)根据SEQ ID NO:44和/或SEQ ID NO:47的分离的多肽，其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，和/或

[1447] c)根据SEQ ID NO:45和/或SEQ ID NO:48的分离的多肽，其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化。

[1448] 在所有方面的优选实施方式中，抗体或抗原结合片段(特异性地)以<15nM、<10nM、<5nM、<1nM或<0.6nM的EC50结合

[1449] a)人CCR8和/或根据SEQ ID NO:43和/或SEQ ID NO:46的分离的多肽，其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，和/或

[1450] b)食蟹猴CCR8和/或根据SEQ ID NO:44和/或SEQ ID NO:47的分离的多肽，其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，和/或

[1451] c)鼠CCR8和/或根据SEQ ID NO:45和/或SEQ ID NO:48的分离的多肽，其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化，

[1452] 并且任选地以<50nM、<25nM、<15nM或<10nM的EC50与激活的人调节性T细胞结合。

[1453] 根据这些实施方式中的一些最优选的实施方式，结合人CCR8或根据SEQ ID NO:46的分离的多肽(其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化)的抗体或抗原结合片段的EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5nM或0.25nM，并且结合食蟹猴CCR8或根据SEQ ID NO:47的分离的多肽(其中Y3、Y15和Y17的至少两个或所有已被硫酸化)的EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5nM或0.25nM。

[1454] 如例如实施例10.1.1中所公开的，根据本发明的抗体对其各自的靶标具有极好的亲和力。例如，交叉反应抗体TPP-21181、TPP-17578、TPP-19546、TPP-18206、TPP-21360和TPP-23411结合人CCR8，EC50分别为4.8nM、1.7nM、0.8nM、0.6nM、～0.9nM或1.7nM。此外，TPP-21181、TPP-17578、TPP-19546、TPP-18206、TPP-21360和TPP-23411结合食蟹猴CCR8，EC50为1.8nM、1nM、0.5nM、0.7nM、～0.55nM或0.9nM。此外，TPP-17578、TPP-19546、TPP-18206和TPP-21360与人调节性T细胞结合，EC50为25nM、15nM、23nM或10nM。此外，抗鼠CCR8抗体TPP-14099以3nM的EC50结合表达鼠CCR8的CHO细胞和以13.2nM的EC50结合鼠iTreg，参见表10.1.1.5。

[1455] 在所有方面的优选实施方式中，抗体或抗原结合片段，优选地于浓度为10nM，

[1456] a)不或基本上不或以低于抗体L263G8和433H的程度阻断CCL1诱导的β-arrestin信号传导，和/或

[1457] b)不或基本上不或以低于抗体L263G8和433H的程度诱导ERK1/2磷酸化和/或

[1458] c)不或基本上不或以低于抗体L263G8和433H的程度诱导AKT磷酸化。

[1459] 在所有方面的优选实施方式中,抗体或抗原结合片段阻断趋化因子受体的G蛋白依赖性信号传导。

[1460] 在所有方面的优选实施方式中,抗体或抗原结合片段是无岩藻糖基化的。

[1461] 在所有方面的优选实施方式中,抗体或抗原结合片段

[1462] a)以低于530nM、500nM、450nM、400nM、300nM或200nM的解离常数(KD)结合人Fcγ受体IIIA变体V176(CD16a),和/或

[1463] b)以低于30μM、20μM、10μM、5μM或1μM的解离常数(KD)结合人FcγRIIA(CD32a)。

[1464] 在所有方面的优选实施方式中,抗体或抗原结合片段

[1465] a)通过人效应细胞(例如人NK细胞)在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),和/或

[1466] b)通过人类效应细胞(例如人类巨噬细胞)在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)。

[1467] 在所有方面的优选实施方式中,抗体或抗原结合片段诱导ADCC和/或ADCP并且

[1468] a)ADCC诱导的激活人调节性T细胞的最大耗竭为至少为30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%,和/或

[1469] b)ADCP诱导的激活人调节性T细胞的最大耗竭为至少为5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%或50%,和/或

[1470] c)在体外或受试者中,肿瘤内调节性T细胞的最大耗竭为至少为50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。

[1471] 在所有方面的优选实施方式中,抗体或抗原结合片段的EC50

[1472] a)对于ADCC诱导的激活人调节性T细胞的耗竭,低于100pM、50pM、25pM、12.5pM、10pM或5pM和/或

[1473] b)对于ADCP诱导的激活人调节性T细胞的耗竭,低于500pM、250pM、200pM、150pM、100pM、75pM、50pM或25pM。

[1474] 优选地,在所有方面的优选的实施方式中,有效剂量的抗体或抗原结合片段

[1475] a)在体外或受试者中,将激活或肿瘤内调节性T细胞的数量减少到低于30%、25%、20%、10%、5%或1%和/或

[1476] b)在体外或受试者中,将肿瘤内CD8+T细胞与肿瘤内Tregs的比率增加至至少5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或更高和/或

[1477] c)在体外或受试者中,将肿瘤内CD4+ T细胞的调节性T细胞的百分比降低至<30%、<20%、<10%或<5%。

[1478] 在所有方面的优选实施方式中,抗体或抗原结合片段增加限定肿瘤体积中免疫细胞的绝对数量,至少增加1.5、2、2.5、3、3.5或4倍,优选地其中免疫细胞选自

[1479] a)(肿瘤内)CD45+细胞,

[1480] b)(肿瘤内)CD8+ T细胞,

[1481] c)(肿瘤内)CD4+ T细胞,

[1482] d)(肿瘤内)巨噬细胞,例如M1巨噬细胞或M2巨噬细胞,

[1483] e)(肿瘤内)NK细胞,

[1484] f)(肿瘤内)B细胞，

[1485] g)(肿瘤内)树突状细胞，

[1486] h)(肿瘤内)γδT细胞，

[1487] i)(肿瘤内)iNKT细胞，

[1488] 或其任何组合。

[1489] 例如，免疫细胞是

[1490] a)CD8+ T细胞、CD4+ T细胞和巨噬细胞，或

[1491] b)CD8+ T细胞、CD4+ T细胞、NK细胞和巨噬细胞，或

[1492] c)CD8+ T细胞、ACOD1+巨噬细胞(M1巨噬细胞)和B细胞。

[1493] 在所有方面的优选实施方式中，三剂或更多有效剂量的抗体或抗原结合片段在肿瘤中增加

[1494] a)肿瘤内CD8+ T细胞的数量至至少150％、200％、250％、300％或350％，

[1495] b)肿瘤内CD8+ T细胞与肿瘤内调节性T细胞的比率至至少4、5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150,200,或更高，

[1496] c)肿瘤内巨噬细胞的数量至少2、3、4或5倍，

[1497] d)肿瘤内ACOD1+巨噬细胞(M1巨噬细胞)的数量至少2、3、4、5、6、7、8、9或10倍，

[1498] e)ACOD1+巨噬细胞(M1巨噬细胞)与MRC1+巨噬细胞(M2巨噬细胞)的比率至少1.5、2、3、4、5、10或更高，

[1499] f)肿瘤内NK细胞的数量至至少140％或200％，

[1500] g)肿瘤内CD3+ T细胞的数量至至少150％、200％、300％或400％，

[1501] h)肿瘤内B细胞的数量至少2、5、10、20、30或40倍，

[1502] i)肿瘤内CD45+ T细胞的数量至至少150％、200％或300％，和/或

[1503] j)肿瘤内CD4+ T细胞的数量至至少150％、200％、300％或400％，

[1504] 优选地其中肿瘤的特征在于肿瘤浸润性淋巴细胞，例如肿瘤浸润性T细胞。

[1505] 在所有方面的优选实施方式中，抗体或抗原结合片段诱导三级淋巴结构的形成。

[1506] 在所有方面的优选实施方式中，抗体是IgG抗体，优选地人IgG1或鼠IgG2a。

[1507] 在所有方面的优选实施方式中，抗体或抗原结合片段以<15nM、<10nM、<5nM、<1nM或<0.6nM的EC50结合

[1508] a)人CCR8或根据SEQ ID NO:46的分离多肽，其中Y3、Y15和Y17的至少两个或全部已被硫酸化，和/或

[1509] b)食蟹猴CCR8或根据SEQ ID NO:47的分离的多肽，其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化，和/或

[1510] c)鼠CCR8或根据SEQ ID NO:48的分离的多肽，其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化。

[1511] 在所有方面的优选实施方式中，结合人CCR8或根据SEQ ID NO:46的分离的多肽(其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化)的抗体或抗原结合片段的EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5nM或0.25nM，结合食蟹猴CCR8或根据SEQ ID NO:47的分离的多肽(其中Y3、Y15和Y17中至少两个或全部已被硫酸化)的抗体或抗原结合片段的EC50低于10nM、5nM、2.5nM、1nM、0.5nM或0.25nM。

[1512] 在所有方面的优选的实施方式中，分离的抗体或抗原结合片段以＜50nM、＜25nM、＜15nM或＜10nM的EC50与激活的人调节性T细胞结合。

[1513] 在所有方面的优选的实施方式中，抗体结合第一分离的非硫酸化多肽的解离常数高于100nM、150nM、200nM、250nM、300nM、350nM、400nM、450nM、500nM,600nM,700nM,800nM,900nM,1μM,1.25μM,1.5μM,1.75μM,2μM,2.25μM,2.5μM,2.75μM,或3μM,或检测不到。优选地，抗体结合第一分离的非硫酸化多肽的解离常数高于100nM、250nM、500nM、1μM、2μM或3μM,或者不可检测。

[1514] “所有方面”的最优选组合

[1515] 根据优选的实施方式I，提供一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体或抗原结合片段是非内化的或特征在于以低于同种型对照内化的1.5、2、3、4、5、6、7或10倍内化进入具有内源靶标表达的细胞。

[1516] 根据优选的实施方式II，提供了一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体或片段的特征在于HCDR3区包含10至34％的酪氨酸和/或2至20％的组氨酸。

[1517] 根据优选的实施方式III，提供了一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体包含人源CDR。

[1518] 根据优选的实施方式IV，提供了一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体或抗原结合片段对来自至少两个物种(优选地选自人、食蟹猴和小鼠)的CCR8具有交叉反应性，最优选地，其中抗体或抗原结合片段对人和食蟹猴CCR8具有交叉反应性。

[1519] 根据优选的实施方式V，提供了一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体或抗原结合片段，

[1520] a.不阻断CCL1诱导的β-arrestin信号传导和/或

[1521] b.不诱导ERK1/2磷酸化和/或

[1522] c.不诱导AKT磷酸化。

[1523] 根据优选的实施方式VI，提供了一种特异性结合CCR8的分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体或抗原结合片段是非岩藻糖基化的并且

[1524] a.通过人效应细胞例如人NK细胞在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)，和

[1525] b.通过人效应细胞例如人巨噬细胞在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)，

[1526] c.其中最大的ADCC和ADCP诱导的表达人CCR8的靶细胞的体外耗竭为至少30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、70％、80％、90％、95％或99％。

[1527] 根据优选的实施方式VII，提供了根据优选的实施方式II至VI中任一项的分离的抗体或抗原结合片段，其中抗体或抗原结合片段是非内化的或特征在于以低于同种型对照内化的1.5、2、3、4、5、6、7或10倍内化进入具有内源靶标表达的细胞。

[1528] 根据优选的实施方式VIII，提供了根据优选的实施方式I或III至VII中任一项的分离的抗体或抗原结合片段，其中抗体或抗原结合片段的特征在于HCDR3区包含10至34％的酪氨酸和/或2至20％的组氨酸。

[1529] 根据优选的实施方式IX，提供了根据优选的实施方式I至II或IV至VIII中任一项

的分离的抗体或抗原结合片段,其中抗体包含人来源的CDR。

[1530] 根据优选的实施方式X,提供了根据优选的实施方式I至III或V至IX中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段对来自至少两个物种(优选地选自人、食蟹猴和小鼠)的CCR8具有交叉反应性,最优选其中抗体或抗原结合片段对人和猕猴CCR8具有交叉反应性。

[1531] 根据优选的实施方式XI,提供了根据优选的实施方式I至X中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段以第一解离常数KD结合来自第一物种的CCR8并以第二解离常数KD结合来自具有第二物种的CCR8,其中第一和第二解离常数处于相同数量级。

[1532] 根据优选的实施方式XII,提供了根据优选的实施方式I至IV或VI至XI中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段,

[1533] a.不阻断CCL1诱导的β-arrestin信号传导和/或

[1534] b.不诱导ERK1/2磷酸化和/或

[1535] c.不诱导AKT磷酸化。

[1536] 根据优选的实施方式XIII,提供了根据优选的实施方式I至V或VII至XII中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段

[1537] a.通过人效应细胞(例如人NK细胞)在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),和

[1538] b.通过人效应细胞(例如人类巨噬细胞)在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP),和任选地

[1539] c.其中最大的ADCC和ADCP诱导的表达人CCR8的靶细胞的体外耗竭为至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。

[1540] 根据优选的实施方式XIV,提供了根据优选的实施方式I至XIII中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段特异性结合CCR8的富含硫酸化酪氨酸的结构域。

[1541] 根据优选的实施方式XV,提供了根据优选的实施方式I至XIV中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段特异性(i)以EC50<15nM,<10nM,<5nM,<1nM或<0.6nM结合

[1542] a.人CCR8和/或根据SEQ ID NO:46的分离的多肽,其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,和/或

[1543] b.食蟹猴CCR8和/或根据SEQ ID NO:47的分离的多肽,其中Y3、Y15和Y17中的至少两个或全部已被硫酸化,和/或

[1544] c.鼠CCR8和/或根据SEQ ID NO:48的分离的多肽,其中Y3、Y14和Y15中的至少两个或全部已被硫酸化,

[1545] 和/或(ii)以EC50<50nM、<25nM、<15nM或<10nM结合激活的人调节性T细胞。

[1546] 根据优选的实施方式XVI,提供了根据优选的实施方式I至XV中任一项的分离的抗体或其抗原结合片段,

[1547] a.其中抗体或抗原结合片段以低于530nM、500nM、450nM、400nM、300nM或200nM的解离常数(KD)结合人Fcγ受体IIIA变体V176(CD16a),和/或

[1548] b.其中抗体或抗原结合片段以低于30μM、20μM、10μM、5μM或1μM的解离常数(KD)结合人FcγRIIA(CD32a)。

[1549] 根据优选的实施方式XVII,提供了根据优选的实施方式I至XVI中任一项的分离的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段是无岩藻糖基化的。

[1550] 根据优选的实施方式XVIII,提供了根据优选的实施方式I至XVII中任一项的分离的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段

[1551] a.通过人效应细胞(例如人NK细胞)在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),和/或

[1552] b.通过人效应细胞(例如人类巨噬细胞)在表达人CCR8的靶细胞中诱导抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP),

[1553] 优选地,其中

[1554] c.ADCC诱导的激活人调节性T细胞的最大耗竭为至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%,和/或

[1555] d.ADCP诱导的激活人调节性T细胞的最大耗竭为至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%或50%,和/或

[1556] e.最大的ADCC和ADCP诱导的激活人调节性T细胞的体外耗竭为至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。

[1557] 根据优选的实施方式XIX,提供了根据优选的实施方式I至XVIII中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中

[1558] a.抗体或抗原结合片段对ADCC诱导的激活人调节性T细胞的耗竭的EC50低于100pM、50pM、25pM、12.5pM、10pM或5pM和/或

[1559] b.抗体或抗原结合片段对ADCP诱导的激活人调节性T细胞的耗竭的EC50低于500pM、250pM、200pM、150pM、100pM、75pM、50pM或25pM。

[1560] 根据优选的实施方式XX,根据了任何前述优选的实施方式的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段的有效剂量

[1561] a.在体外或受试者中将激活或肿瘤内调节性T细胞的数量减少至低于50%、40%、30%、25%、20%、10%、5%或1%和/或

[1562] b.在体外或受试者中将肿瘤内CD8+ T细胞与肿瘤内Treg的比率增加至至少5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或更高和/或

[1563] c.在体外或受试者中,将肿瘤内CD4+ T细胞的调节性T细胞的百分比减少至<30%、<20%、<10%或<5%。

[1564] 根据优选的实施方式XXI,提供了根据任何前述优选的实施方式的分离的抗体或抗原结合片段,其中有效剂量的抗体或抗原结合片段诱导肿瘤中三级淋巴结构的形成。

[1565] 根据优选的实施方式XXII,提供了根据任何前述优选的实施方式的分离的抗体或抗原结合片段,其中抗体是IgG抗体,优选地人IgG1或鼠IgG2a,和/或其中抗原结合片段是到scFv、Fab、Fab'或F(ab')2片段。

[1566] 根据优选的实施方式XXIII,提供了包含根据优选的实施方式I至XXII中任一项的抗体或抗原结合片段的缀合物,优选地,其中缀合物包含

[1567] a.放射性元素,

[1568] b.细胞毒性剂,例如auristatin、美登木素生物碱、驱动蛋白纺锤体蛋白抑制剂、烟酰胺磷酸核糖基转移酶抑制剂或吡咯并苯二氮䓬衍生物,

[1569] c.进一步的抗体或抗原结合片段,或

[1570] d.嵌合抗原受体。

[1571] 根据优选的实施方式XXIV,提供了药物组合物,其包含根据优选的实施方式I至XXII中任一项的抗体或抗原结合片段或根据优选的实施方式XXIII的缀合物。

[1572] 根据优选的实施方式XXV,提供了根据优选的实施方式XXIV的药物组合物,其包含一种或多种进一步的治疗活性化合物,优选地选自

[1573] a.靶向检查点蛋白的抗体或化合物,例如PD1、PD-L1或CTLA-4,优选地,其中靶向检查点蛋白的抗体或化合物是Nivolumab,Pembrolizumab,Atezolizumab,Avelumab,Durvalumab,Cemiplimab,Dostarlimab或Ipilimumab,

[1574] b.靶向另外的趋化因子受体的抗体,例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1或CXCR1,

[1575] c.靶向HER2和/或EGFR的抗体或小分子,

[1576] d.任何头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌和食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌和/或前列腺癌的标准治疗,

[1577] e.化疗剂,优选地紫杉烷、紫杉醇、多柔比星、顺铂、卡铂、奥沙利铂或吉西他滨,

[1578] e.B细胞消耗剂,例如抗CD19抗体或抗CD20抗体和/或

[1579] f.靶向激酶抑制剂,如索拉非尼、瑞戈非尼或MEKi-1。

[1580] 根据优选的实施方式XXVI,提供了根据优选的实施方式I至XXII中任一项的抗体或抗原结合片段或根据优选的实施方式XXIII的缀合物或根据优选实施方式XXIV或XXV的药物组合物用作药物。

[1581] 根据优选的实施方式XXVII,提供了根据优选的实施方式I至XXII中任一项的抗体或抗原结合片段或根据优选的实施方式XXIII的缀合物或根据优选的实施方式XXIV或XXV的药物组合物,用于治疗肿瘤或以CCR8阳性细胞为特征的疾病,例如CCR8阳性调节性T细胞。

[1582] 根据优选的实施方式XXVIII,提供了根据优选的实施方式I至XXII中任一项的抗体或抗原结合片段或根据优选的实施方式XXIII的缀合物或根据优选的实施方式XXIV或XXV的药物组合物,用于(i)优选地与选自以下地一种或多种另外的治疗活性化合物同时、分开、或顺序组合

[1583] a.靶向检查点蛋白的抗体或化合物,例如PD1、PD-L1或CTLA-4,优选地,其中靶向检查点蛋白的抗体或小分子是Nivolumab,Pembrolizumab,Atezolizumab,Avelumab,Durvalumab,Cemiplimab,Dostarlimab或Ipilimumab,

[1584] b.靶向另外的趋化因子受体的抗体,例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1或CXCR1,

[1585] c.靶向肿瘤细胞特异性表达的蛋白的抗体,

[1586] d.靶向HER2和/或EGFR的抗体或小分子,

[1587] e.任何头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌和食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌和/或前列腺癌的标准治疗,

[1588] f.化疗剂,优选地紫杉烷、紫杉醇、多柔比星、顺铂、卡铂、奥沙利铂或吉西他滨,和/或

[1589] g.靶向激酶抑制剂,如索拉非尼、瑞戈非尼或MEKi-1。

[1590] (ii)与放射疗法组合,和/或(iii)与耗竭肿瘤内B细胞组合,以治疗以CCR8阳性细胞例如CCR8阳性调节性T细胞为特征的肿瘤或疾病。

[1591] 根据优选的实施方式XXIX,提供了用于优选的实施方式XXVII或XXVIII的抗体、片段、缀合物或药物组合物,其中肿瘤选自T细胞急性淋巴细胞白血病、乳腺癌、三阴性乳腺癌癌症、三重阳性乳腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、睾丸癌、胃癌、头颈部鳞状细胞癌、胸腺瘤、食道腺癌、结直肠癌、胰腺癌、卵巢癌或宫颈癌、急性髓性白血病、肾癌、膀胱癌、皮肤癌、黑色素瘤、甲状腺癌、间皮瘤、肉瘤和前列腺癌、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤或涉及CCR8表达细胞的任何其他癌症,优选地其中肿瘤选自头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌、食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌、前列腺癌、B细胞淋巴瘤和T细胞淋巴瘤。根据优选的实施方式XXX,提供了用于优选的实施方式XXVI至XXIX的抗体、片段、缀合物或药物组合物,其中该用途包括确定

[1592] a.肿瘤浸润淋巴细胞的存在或数量,

[1593] b.巨噬细胞和/或NK细胞的存在或数量,

[1594] c.CCR8阳性或FOXP3阳性调节性T细胞的存在或数量,

[1595] d.肿瘤突变负荷,

[1596] e.癌症分期,

[1597] f.干扰素刺激基因或蛋白的存在、水平或激活,

[1598] g.CCR8表达,

[1599] h.补体因子蛋白、丝氨酸蛋白酶抑制剂和/或MHC成分的存在或数量,

[1600] i.细胞因子的存在或数量,例如炎性或抑制性细胞因子,

[1601] j.免疫基因表达的激活,和/或

[1602] k.免疫检查点(蛋白)表达,例如PD-(L)1或CTLA4表达,

[1603] l.肿瘤浸润性CD19+ B细胞的存在或数量,

[1604] m.肿瘤浸润性CD8+ T细胞的存在或数量;

[1605] 以预测或监测治疗成功率。

[1606] 根据优选的实施方式XXXI,提供了编码根据优选的实施方式I至XXII中任一项的抗体或抗原结合片段的多核苷酸。

[1607] 根据优选的实施方式XXXII,提供了包含根据优选的实施方式XXXI的多核苷酸的载体。

[1608] 根据优选的实施方式XXXIII,提供了一种分离的细胞,其被安排用于产生根据优选的实施方式I至XXII中任一项的抗体或抗原结合片段。

[1609] 根据优选的实施方式XXXIV,提供了一种产生根据优选的实施方式I至XXII中任一项的抗体或抗原结合片段或根据优选的实施方式XXIII的缀合物的方法,其包括培养根据优选的实施方式XXXIII的细胞和任选地纯化抗体或抗原结合片段。

[1610] 根据优选的实施方式XXXV,提供了根据优选的实施方式I至XXII中任一项的抗体或抗原结合片段或根据优选的实施方式XXIII的缀合物用作体内或体外诊断剂。

[1611] 根据优选的实施方式XXXVI，提供了一种试剂盒，其包含根据优选的实施方式I至XXII中任一项的抗体或抗原结合片段或根据优选的实施方式XXIII的缀合物或根据优选的实施方式XXIV或XXV的药物组合物以及使用说明书。

[1612] 方面19-抗体缀合物

[1613] 除了裸抗体外，还可以使用本文所公开的抗体或抗原结合片段设计各种其他基于抗体或抗体片段的缀合物。这些缀合物可以是用于诊断、治疗、研究应用和各种其他目的的缀合物。提供了例如与放射性核素、细胞毒性剂、有机化合物、蛋白质毒素、免疫调节剂例如细胞因子、荧光部分、细胞缀合的抗体或其抗原结合片段，另外的抗体或其抗原结合片段。

[1614] 本文公开的缀合物例如抗体药物缀合物(ADC)、靶向钍缀合物(TTC)、双特异性抗体等本质上是“模块”的。在整个公开内容中，描述了构成缀合物的各种“模块”的各种特定实施方式。作为具体的非限制性实例，描述了可以构成ADC的抗体或其片段、接头和细胞毒性剂和/或细胞抑制剂的具体实施方式。意图是所有描述的具体实施方式可以相互组合，就好像每个具体组合被明确地单独描述一样。

[1615] 根据第十九方面，提供了包含根据第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七和/或第十八方面的抗体或抗原结合片段的缀合物或其组合。例如，缀合物包含根据第六方面的抗体或抗原结合片段。例如，缀合物包含根据第七方面的抗体或抗原结合片段。例如，缀合物包含根据第八方面的抗体或抗原结合片段。例如，缀合物包含根据第9方面的抗体或抗原结合片段。例如，缀合物包含第十方面的抗体或抗原结合片段。例如，缀合物包含根据第十一方面的抗体或抗原结合片段。例如，缀合物包含根据第十二方面的抗体或抗原结合片段。例如，缀合物包含第十三方面的抗体或抗原结合片段。例如，缀合物包含根据第十四方面的抗体或抗原结合片段。例如，缀合物包含根据第十五方面的抗体或抗原结合片段。例如，缀合物包含根据第十六方面的抗体或抗原结合片段。例如，缀合物包含根据第十七方面的抗体或抗原结合片段。例如，缀合物包含根据第十八方面的抗体或抗原结合片段。

[1616] 根据一些优选的实施方式，缀合物包含(a)放射性元素，(b)细胞毒性剂，例如auristatin、美登木素生物碱、驱动蛋白-纺锤体蛋白(KSP)抑制剂、烟酰胺磷酸核糖基转移酶(NAMPT)抑制剂或吡咯并苯二氮䓬衍生物，(c)进一步的抗体或抗原结合片段，(d)嵌合抗原受体。

[1617] 放射性缀合物

[1618] 根据第十九方面的一些第一实施方式，缀合物包含或被设置成包含放射性核素，例如β粒子、α粒子或俄歇电子发射体。根据本发明的合适的β发射体是例如钇-90、碘-131、锶-89-氯化物、镥-177、钬-166、铼-186、铼-188、铜-67、钷-149、金-199，和铑-105。根据本发明，合适的俄歇电子发射体是例如溴-77、铟-11、碘-123和碘-125。根据本发明，合适的α发射体是例如钍-227、铋-213、镭-223、锕-225和砹-211。

[1619] 例如，钍-227(227Th)可以有效地与和本发明的抗体缀合的八齿3,2-羟基吡啶酮(3,2-HOPO)螯合剂复合，产生高度稳定的靶向钍-227缀合物(TTC)，例如实施例13中所述。靶向钍缀合物(TTC)包含三个主要结构单元。在钍-227的β粒子衰变之后，第一个组成部分，放射性核素^{227Th}的发射α粒子的通过离子交换色谱法纯化。第二个组成部分是螯合剂，例如含有HOPO基团的铁载体衍生螯合剂，其在对称的聚胺支架上(用羧酸接头功能化以进行生

物缀合)带有四个3-羟基-N-甲基-2一吡啶酮部分。可以通过与赖氨酸残基的ε-氨基形成酰胺键来实现与靶向部分的缀合。这些八齿3,2-HOPO螯合剂可以用227Th有效标记,在环境条件下具有高产率、纯度和稳定性。与经常需要加热的四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)螯合剂相比,HOPO螯合剂由于在环境温度下有效的放射性标记和形成的复合物的高稳定性而具有优势。第三个组成部分是靶向部分,即根据方面6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18的任一方面的趋化因子受体抗体或其抗原结合部分。

[1620] ADC

[1621] 根据第十九方面的一些第二实施方式,缀合物包含细胞毒性剂,例如以形成抗体药物缀合物(ADC)。

[1622] 在一些优选的实施方式中,细胞毒性剂是auristatin、美登木素生物碱、驱动蛋白-纺锤体蛋白(KSP)抑制剂、烟酰胺磷酸核糖基转移酶(NAMPT)抑制剂或吡咯并苯二氮䓬衍生物。包含美登木素生物碱的缀合物的产生可如Chari,Ravi VJ,et al."Immunoconjugates containing novel maytansinoids:promising anticancer drugs."Cancer research 52.1(1992):127-131或EP2424569 B1,两者的全部内容通过引用并入本文。包含驱动蛋白-纺锤体蛋白(KSP)抑制剂的缀合物的产生可以如WO2019243159 A1中所述发生,其全部内容通过引用并入本文。包含烟酰胺磷酸核糖基转移酶(NAMPT)抑制剂的缀合物的产生可以如WO2019149637 A1中所述,其全部内容通过引用并入本文。包含吡咯并苯并二氮杂䓬的缀合物的产生可以如EP3355935 A1中所述,其全部内容通过引用并入本文。

[1623] 抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的细胞毒性剂和/或细胞抑制剂可以是已知抑制细胞生长和/或复制和/或杀死细胞的任何试剂。许多具有细胞毒性和/或细胞生长抑制特性的试剂在文献中是已知的。细胞毒性剂和/或细胞生长抑制剂的非限制性实例包括,例如但不限于细胞周期调节剂、细胞凋亡调节剂、激酶抑制剂、蛋白质合成抑制剂、烷化剂、DNA交联剂、嵌入剂、线粒体抑制剂、核输出抑制剂、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、RNA/DNA抗代谢物和抗有丝分裂剂。

[1624] 将细胞毒性剂和/或细胞抑制剂连接到抗趋化因子受体或抗CCR8ADC的抗原结合部分的接头在性质上可以是长的、短的、柔性的、刚性的、亲水的或疏水的,或者可以包含具有不同的特性的片段,例如柔性片段、刚性片段等。接头可对细胞外环境化学稳定,例如,在血流中化学稳定,或者可包括不稳定的接头并释放细胞毒性剂和/或细胞抑制剂到胞外环境中。在一些实施方式中,接头包括被设计成在抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC在细胞内内化时释放细胞毒性剂和/或细胞抑制剂的连接。在一些具体的实施方式中,接头包括被设计成在细胞内特异性或非特异性地切割和/或牺牲或以其他方式分解的连接。用于将药物连接至抗原结合部分(例如ADC背景下的抗体)的多种接头在本领域中是已知的。任何这些接头以及其他接头可用于将细胞毒性剂和/或细胞生长抑制剂连接到抗趋化因子受体或抗CCR8ADC的抗原结合部分。

[1625] 与抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的抗原结合部分相连的细胞毒性剂和/或细胞抑制剂的数量(药物抗体比率:DAR)可变化,并且仅受抗原结合部分上的可用连接位点的数量和连接到单个接头的试剂的数量的限制。通常,接头将单个细胞毒性剂和/或细胞抑制剂连接至抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的抗原结合部分。在包含不止一种细胞毒性剂和/或细胞抑制剂的抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的实施方式中,每种试剂可以相同或不同。只要

抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC在使用和/或储存条件下不表现出不可接受的聚集水平,考虑抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC,DAR为20,甚至更高。在一些实施方式中,本文描述的抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的DAR可能在约1-10、1-8、1-6或1-4的范围内。在某些具体的实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的DAR可为2、3或4。在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC是根据结构式(I)的化合物:

[1626] [D-L-XY]n-Ab(I)

[1627] 或其盐,其中每个"D"独立于其他代表细胞毒性剂和/或细胞生长抑制剂;每个"L"独立于其他代表接头;"Ab"代表抗趋化因子受体结合部分,例如根据本发明的抗CCR8抗体;每个"XY"代表在接头上的官能团Rx和抗趋化因子受体结合部分上的"互补"官能团Ry之间形成的连接;n代表抗趋化因子受体ADC的DAR。

[1628] 在一个具体的示例性实施方式中,抗趋化因子受体ADC是根据结构式(I)的化合物,其中每个"D"相同并且是细胞渗透性auristatin(例如,dolastatin-10或MMAE)或细胞渗透性小沟结合DNA交联剂;每个"L"是相同的并且是可被溶酶体酶切割的接头;每个"XY"是马来酰亚胺和巯基之间形成的键;"Ab"是包含对应于根据本发明的抗趋化因子受体或CCR8抗体的六个CDR的六个CDR的抗体或其片段;n是2、3或4。在一个具体实施方式中,"Ab"是包含人源CDR的完全人抗体。

[1629] 细胞毒性剂和细胞生长抑制剂是已知抑制细胞生长和/或复制和/或杀死细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤内Treg细胞的试剂。这些化合物可用于与抗趋化因子受体抗体如CCR8抗体的联合治疗,或作为抗趋化因子受体ADC的一部分,如以下所述:

[1630] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是选自以下的细胞生长抑制剂:放射性核素、烷化剂、DNA交联剂、DNA嵌入剂(例如,沟结合剂如小沟结合剂)、细胞周期调节剂、细胞凋亡调节剂、激酶抑制剂、蛋白质合成抑制剂、线粒体抑制剂、核输出抑制剂、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、RNA/DNA抗代谢药和抗有丝分裂剂。

[1631] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是选自以下的烷化剂:asaley(L-亮氨酸,N-[N-乙酰基-4-[双-(2-氯乙基)氨基]-DL苯丙氨酸]-乙酯)的烷基化剂;AZQ(1,4-环己二烯-1,4-二氨基甲酸,2,5-双(1-氮丙啶基)-3,6-二氧代-二乙酯);BCNU(N,N′-双(2-氯乙基)-N-亚硝脲);丁砜(1,4-丁二醇二甲磺酸盐);(羧基邻苯二甲酸)铂;CBDCA(顺-(1,1-环丁烷二羧基)二胺铂(II));CCNU(N-(2-氯乙基)-N′-环己基-N-亚硝脲);CHIP(异丙铂;NSC 256927);氯霉素;氯佐菌素(2-[[[(2-氯乙基)亚硝基氨基]羰基]氨基]-2-脱氧-D-吡喃糖);顺式铂(顺铂);氯介子;氰基吗啉多柔比星;环二酮;二氢半乳糖醇(5,6-二羟基杜洛糖醇);氟多巴((5-[(2-氯乙基)-(2-氟乙基)氨基]-6-甲基-尿嘧啶);庚磺胺;斑蝥酮;吲哚美辛二聚体DGN462;美法仑;甲基CCNU((1-(2-氯乙基)-3-(反-4-甲基环己烷)-1-亚硝基脲);丝裂霉素C;米托唑胺;氮芥((双(2-氯乙基)甲胺盐酸盐);PCNU((1-(2-氯乙基)-3-(2,6-二氧代-3-哌啶基)-1-亚硝基脲));哌嗪烷基化剂(1-(2-氯乙基)-4-(3-氯丙基)-哌嗪盐酸盐);哌嗪二酮;哌嗪(N,N′-双(3-溴丙酰基)哌嗪);博菲霉素(N-甲基丝裂霉素C);螺旋海因芥;特罗西隆(异氰尿酸三缩水甘油酯);四拉丁语;硫代磷酸(N,N′,N″-三-1,2-乙二基硫代磷酰胺);三乙醇胺;尿嘧啶氮芥;Yoshi-864((双(3-甲氧基丙基)胺盐酸盐)。

[1632] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是一种选自以下的

DNA烷化样剂:顺铂;卡铂;奈达铂;奥沙利铂;沙铂;四硝酸三铂;丙卡巴肼;六甲胺;达卡巴嗪;米唑胺;替莫唑胺。

[1633] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是选自以下的烷基化抗肿瘤剂:碳醌;卡莫司汀;氯萘嗪;氯脲佐菌素;多卡霉素;异磷酰胺;福莫司汀;葡磷酰胺;洛莫司汀;甘露硫烷;尼莫司汀;菲铂;溴溴索;雷尼莫司汀;司马司汀;链脲佐菌素;硫特帕;硫丹;三亚醌;三乙烯三聚氰胺;三铂四硝酸盐。

[1634] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是选自以下的DNA复制和修复抑制剂:六甲糖胺;博来霉素;达卡巴嗪;更生霉素;米托布罗糖醇;丝裂霉素;平阳霉素;普霉素;丙卡巴肼;替莫唑胺;ABT-888(veliparib);奥拉帕尼;KU-59436;AZD-2281;AG-014699;BSI-201;BGP-15;INO-1001;ONO-2231。

[1635] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是细胞周期调节剂,例如紫杉醇;Nab-紫杉醇;多烯紫杉醇;长春新碱;长春碱;ABT-348;AZD-1152;MLN-8054;VX-680;Aurora A特异性激酶抑制剂;Aurora B特异性激酶抑制剂和泛Aurora激酶抑制剂;AZD-5438;BMI-1040;BMS-032;BMS-387;CVT-2584;黄酮吡啶醇;GPC-286199;MCS-5A;PD0332991;PHA-690509;seliciclib(CYC-202,R-roscovitines);ZK-304709;AZD4877,ARRY-520;GSK923295A。

[1636] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是细胞凋亡调节剂,例如AT-101((-)棉酚);G3139或oblimersen(Bcl-2靶向反义寡核苷酸);IPI-194;IPI-565;N-(4-(4-((4'-氯(1,1'-联苯)-2-基)甲基)哌嗪-1-基苯甲酰基)-4-(((1R)-3-(二甲基氨基)-1-((苯硫基)甲基)丙基)氨基)-3-硝基苯磺酰胺;N-(4-(4-((2-(4-氯苯基)-5,5-二甲基-1-环己-1-en-1-基)甲基)哌嗪-1-基)苯甲酰基)-4-(((1R)-3-(吗啉-4-基)-1-((苯硫基)甲基)丙基)氨基)-3-((三氟甲基)磺酰基)苯磺酰胺;GX-070(Obatoclax®;1H-吲哚,2-(2-((3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基)亚甲基)-3-甲氧基-2H-吡咯-5-基)-));HGS1029;GDC-0145;GDC-0152;LCL-161;LBW-242;维奈托克;靶向TRAIL或死亡受体(例如DR4和DR5)的药物,例如ETR2-ST01、GDC0145、HGS-1029、LBY-135、PRO-1762;靶向半胱天冬酶、半胱天冬酶调节剂、BCL-2家族成员、死亡结构域蛋白、TNF家族成员、Toll家族成员和/或NF-kappa-B蛋白的药物。

[1637] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是血管生成抑制剂,例如ABT-869;AEE-788;阿昔替尼(AG-13736);AZD-2171;CP-547,632;IM-862;pegaptamib;索拉非尼;BAY43-9006;帕唑帕尼(GW-786034);vatalanib(PTK-787,ZK-222584);舒尼替尼;SU-11248;VEGF陷阱(trap);凡德他尼;ABT-165;ZD-6474;DLL4抑制剂。

[1638] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是一种蛋白酶体抑制剂,例如硼替佐米;卡非佐米;环氧霉素;伊沙佐米;盐孢菌胺A。

[1639] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是一种激酶抑制剂,例如阿法替尼;阿昔替尼;博舒替尼;克唑替尼;达沙替尼;厄洛替尼;福斯塔替尼;吉非替尼;依鲁替尼;伊马替尼;拉帕替尼;乐伐替尼;穆布替尼;尼洛替尼;帕唑帕尼;培加他尼;索拉非尼;舒尼替尼;SU6656;凡德他尼;维罗非尼;CEP-701(来沙替尼);XL019;INCB018424(卢索替尼);ARRY-142886(塞来替尼);ARRY-438162(比尼美替尼);PD-325901;PD-98059;AP-23573;CCI-779;依维莫司;RAD-001;雷帕霉素;替西罗莫司;ATP竞争性TORC1/TORC2抑

制剂,包括PI-103,PP242,PP30,Torin 1;LY294002;XL-147;CAL-120;ONC-21;AEZS-127;ETP-45658;PX-866;GDC-0941;BGT226;BEZ235;XL765。

[1640] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是蛋白质合成抑制剂,例如链霉素;双氢链霉素;新霉素;弗拉霉素;巴龙霉素;核糖霉素;卡那霉素;阿米卡星;阿贝卡星;贝卡那霉素;地贝卡星;妥布霉素;壮观霉素;潮霉素B;巴龙霉素;庆大霉素;奈替米星;西索米星;异帕米星;虫草霉素;星霉素;四环素;强力霉素;氯四环素;氯霉素;去甲金霉素;赖甲环素;甲氧环素;甲环素;米诺环素;土霉素;青霉环素;罗利四环素;四环素;甘氨酰环素;替加环素;恶唑烷酮类;哌唑酯;利奈唑胺;苯唑胺;雷地唑胺;兰贝唑胺;舒特唑胺;泰地唑胺;肽基转移酶抑制剂;氯霉素;阿齐达米考;甲砜霉素;氟苯尼考;侧耳素;瑞他莫林;泰妙菌素;沃尼穆林;阿奇霉素;克拉霉素;地红霉素;红霉素;氟红霉素;交沙霉素;麦迪霉素;米卡霉素;竹桃霉素;罗他霉素;罗红霉素;螺旋霉素;醋竹桃霉素;泰乐菌素;酮内酯;泰利霉素;赛红霉素;索利霉素;克林霉素;林可霉素;吡利霉素;链霉素;原始霉素;奎奴普汀/达福普汀;弗吉尼亚霉素。

[1641] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是组蛋白去乙酰化酶抑制剂,例如伏立诺他;罗米地辛;西达本胺;帕比司他;丙戊酸;贝利司他;莫西司他;abexinostat;恩替司他;SB939(pracinostat);瑞米司他;吉维司他;奎辛司他;硫脲基丁腈(Kevetrin™);CUDC-10;CHR-2845(替非司他);CHR-3996;4SC-202;CG200745;ACY-1215(罗西林司他);ME-344;萝卜硫素。

[1642] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是拓扑异构酶I抑制剂,例如喜树碱;各种喜树碱衍生物和类似物(例如,NSC 100880,NSC 603071,NSC 107124,NSC 643833,NSC 629971,NSC 295500,NSC 249910,NSC 606985,NSC 74028,NSC 176323,NSC 295501,NSC 606172,NSC 606173,NSC 610458,NSC 618939,NSC 610457,NSC 610459,NSC 606499,NSC 610456,NSC 364830,and NSC 606497);吗啉异柔比星;SN-38。

[1643] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是拓扑异构酶II抑制剂,例如多柔比星;amonafide(苯并异喹啉二酮);m-AMSA(4'-(9-吖啶基氨基)-3'-甲氧基甲磺酰苯胺);蒽吡唑衍生物((NSC 355644);依托泊苷(VP-16);吡唑并吖啶((吡唑并[3,4,5-kl]吖啶-2(6H)-丙胺,9-甲氧基-N,N-二甲基-5-硝基-,单甲磺酸盐);盐酸比生群;柔红霉素;脱氧阿霉素;米托蒽醌;美诺加林;N,N-二苄柔红霉素;奥蒽唑;鲁必达宗;替尼泊苷。

[1644] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是DNA嵌入剂,例如蒽霉素;奇霉素A;托马霉素;DC-81;西布罗霉素;吡咯并二氮杂吡啶衍生物;SGD-1882((S)-2-(4-氨基苯基)-7-甲氧基-8-(3S)-7-乙氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11-二氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂辛-8-基)氧基)丙氧基)-1H苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]氮杂辛-5(11aH)-酮);SG2000(SJG-136;(11a S,11a′S)-8,8′-(丙烷-1,3-二基双(氧基))双(7-甲氧基-2-亚甲基-2,3-二氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂-5(11aH)-酮))。

[1645] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是RNA/DNA抗代谢物,例如L-腺苷;5-氮杂胞苷;5-氟尿嘧啶;阿西维素;氨基蝶呤衍生物N-[2-氯-5[[(2,4-二氨基-5-甲基-6-喹唑啉基)甲基]氨基]苯甲酰基]L-天冬氨酸(NSC 132483);氨基蝶呤衍生

物N-[4-[[(2,4-二氨基-5-乙基-6-喹唑啉基)甲基]氨基]苯甲酰基]L-天冬氨酸;氨基蝶呤衍生物N-[2-氯-4-[[(2,4-二氨基-6-蝶啶基)甲基]氨基]苯甲酰基]L-天冬氨酸一水合物;抗叶酸剂PT523((Nα-(4-氨基-4-脱氧蝶酰基)-Nγ-半邻苯二甲酰基-L-鸟氨酸));Baker的可溶性抗叶酸(NSC 139105);二氯烯丙基劳松((2-(3,3-二氯烯基)-3-羟基-1,4-萘醌);布雷奎纳;氟替呋((前药;5-氟-1-(四氢-2-呋喃基)-尿嘧啶);5,6-二氢-5-氮杂胞苷;甲氨蝶呤;甲氨蝶呤衍生物(N-[[4-[[(2,4-二氨基-6-蝶啶基)甲基]甲基氨基]-1-萘基]羰基]-L-谷氨酸);PALA((N-(膦酰基)-L-天冬氨酸);吡唑福林;甲氨蝶呤。

[1646] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是DNA抗代谢物,例如3-HP;2'-脱氧-5-氟尿苷;5-HP;α-TGDR(α-2'-脱氧6-硫鸟苷);阿非迪霉素甘氨酸盐;ara C(阿糖胞苷);5-aza-2'-脱氧胞苷;β-TGDR(β-2'-脱氧6-硫鸟苷);环胞苷;胍唑;羟基脲;肌苷糖二醛;麦克菌素II;吡唑并咪唑;硫鸟嘌呤;硫嘌呤。

[1647] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是线粒体抑制剂,例如胰酶抑素;苯潘他汀;罗丹明-123;雪草碱;d-α-生育酚琥珀酸酯;化合物11β;阿司匹林;椭圆菌素;黄连素;天青素;GX015-070(Obatoclax®;1H-吲哚,2-(2-((3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基)亚甲基)-3-甲氧基-2H-吡咯-5-基)-);雷公藤酚(雷公藤碱);二甲双胍;亮绿色;ME-344。

[1648] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是抗有丝分裂剂,例如别秋水仙碱;auristatin,例如MMAE(单甲基auristatin E)和MMAF(单甲基auristatin F);软海绵素B;西马多汀;秋水仙碱;秋水仙碱衍生物(N-苯甲酰-脱乙酰基苯甲酰胺);海兔毒素10;海兔毒素15;美登素;美登木素生物碱,例如DM1(N2'-脱乙酰基-N2'-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素);罗佐辛;紫杉醇;紫杉醇衍生物((2'-N-[3-(二甲基氨基)丙基]戊二酸紫杉醇);多烯紫杉醇;硫秋水仙碱;三苯甲基半胱氨酸;硫酸长春碱;硫酸长春新碱。

[1649] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是一种核输出抑制剂,例如callystatin A;内酯霉素;KPT-185(丙-2-基(Z)-3-[3-[3-甲氧基-5-(三氟甲基)苯基]-1,2,4-三唑-1-基]丙-2-烯酸酯);卡苏霉素A;瘦素;钩端呋喃A;来普霉素B;拉贾酮;Verdinexor((Z)-3-[3-[3,5-双(三氟甲基)苯基]-1,2,4-三唑-1-基]-N-吡啶-2-基丙基-2-烯酰肼)。

[1650] 在一些实施方式中,抗趋化因子受体或抗CCR8 ADC的药物部分是激素治疗剂,例如阿那曲唑;依西美坦;阿佐昔芬;比卡鲁胺;西曲瑞克;地加瑞克;地洛瑞林;三氯烷;地塞米松;氟他胺;雷洛昔芬;法莫唑;托瑞米芬;氟维司群;来曲唑;福美坦;糖皮质激素;阿霉素;司维拉姆碳酸盐;拉索昔芬;醋酸亮丙瑞林;甲地孕酮;米非司酮;尼鲁米特;柠檬酸他莫昔芬;阿巴瑞克;强的松;非那雄胺;利洛司坦;布舍瑞林;促黄体激素释放激素(LHRH);组胺;曲洛司坦或莫德拉斯坦;佛瑞林;戈舍瑞林。

[1651] 这些试剂中的任何一种包括,或可以被修饰以包括,与抗体和/或结合片段的连接位点,其可以被包括在抗趋化因子受体ADC中,例如在抗CCR8 ADC中。

[1652] CAR T细胞

[1653] 根据第十九方面的一些第三实施方式,缀合物是为趋化因子受体或CCR8靶向而工程化的CAR T细胞缀合物。最近,CAR T细胞因其临床成功而受到关注,并加快了FDA的批准,参见WO2020102240,其全部内容通过引用并入本文。在CAR T细胞方法中,T细胞是从患者血

液中收集的,然后经过基因工程化以表达对肿瘤细胞上存在的抗原具有特异性的CAR。然后将这些经过工程化的T细胞重新施用于同一位患者。注射后,CAR T细胞识别靶细胞上的靶抗原以诱导靶细胞死亡。因此,表达嵌合抗原受体的T细胞(CAR T细胞)构成了一种用于肿瘤治疗等医学用途的新模式。嵌合抗原受体(CAR)是一种基因工程受体,旨在靶向特定抗原,例如肿瘤抗原。这种靶向可导致针对肿瘤的细胞毒性,例如,使得表达CAR的CAR T细胞可以通过特定的肿瘤抗原靶向并杀死肿瘤。

[1654] 根据本发明,为CCR8或趋化因子受体识别提供的抗体或抗原结合片段可用于工程化CAR T细胞以特异性识别CCR8表达细胞或表达相应趋化因子受体的细胞。根据本发明的CAR可以包括

[1655] a)识别区,例如源自提供的抗CCR8或抗趋化因子受体抗体的单链片段可变区(scFv),用于识别和结合靶细胞表达的CCR8或趋化因子受体,和

[1656] b)激活信号结构域,例如T细胞的CD3链,可作为CAR中的T细胞激活信号。

[1657] 优选地,根据本发明的CAR包含共刺激结构域(例如,CD137、CD28或CD134)以在体内实现T细胞的延长激活。添加共刺激结构域可增强含有CAR的T细胞的体内增殖和存活,初步临床数据表明,此类构建体是治疗癌症等疾病的有前途的治疗剂。根据本发明,CAR T细胞可用于治疗局部或全身异常存在表达靶趋化因子受体的细胞(特别是CCR8表达细胞,例如Treg细胞)的任何疾病。

[1658] 双特异性

[1659] 根据第十九方面的一些第四实施方式,缀合物是双特异性抗体或多特异性抗体。在一些优选方的实施方式中,双特异性抗体包含至少一个Fc结构域。

[1660] 在第十九方面的一些优选实施方式中,双特异性抗体的第一结合部分是根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段。

[1661] 在第十九方面的第四实施方式的一些实施方式A中,双特异性抗体的第一结合部分是根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段,双特异性抗体的第二结合部分是根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的相同或不同的抗体或抗原结合片段。

[1662] 在第十九方面的第四实施方式的一些实施方式B中,双特异性抗体的第一结合部分是结合人CCR8的根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18的抗体或抗原结合片段,和双特异性抗体的第二结合部分是结合不同趋化因子受体如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1或CXCR1的抗体或抗原结合片段。双特异性抗体的第二结合部分是Mogamulizumab或其抗原结合片段。

[1663] 在第十九方面的第四实施方式的一些实施方式C中,双特异性抗体的第一结合部分是根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18方面的抗体或抗原结合片段,和双特异性抗体的第二结合部分是结合细胞表面蛋白例如免疫细胞或组织上表达的细胞表面蛋白-或细胞类型特异性抗原的抗体或抗原结合片段或。在其中一些实施方式中,双特异性抗体的第二结合部分是靶向检查点蛋白的抗体或抗原结合片段,例如抗PD1抗体、抗PD-L1抗体或CTLA-4抗体。Nivolumab,Pembrolizumab,Atezolizumab,Avelumab,Durvalumab,Cemiplimab,Dostarlimab,或Ipilimumab。在这些实施方式的一些其他实施方式中,双特异

性抗体的第二结合部分是HER2靶向抗体,Trastuzumab,Pertuzumab和/或Margetuximab。

[1664] 在第十九方面的第四实施方式的一些实施方式D中,双特异性抗体的第一结合部分是根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18的抗体或抗原结合片段,优选地结合CCR8,和双特异性抗体的第二结合部分是结合与T细胞激活相关的细胞表面分子的抗体或抗原结合片段,优选地选自CD25、CTLA-4、PD-1、LAG3、TIGIT、ICOS、TNF受体超家族成员、4-1BB、OX-40、GITR。

[1665] 制备双特异性或多特异性抗体的技术包括但不限于重组共表达具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein and Cuello."Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry."Nature 305.5934(1983):537-540.;WO1993008829 A1,和Traunecker,André,Antonio Lanzavecchia,and Klaus Karjalainen."Bispecific single chain molecules(Janusins)target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells."The EMBO Journal 10.12(1991):3655-3659.),和两种不同单克隆抗体的化学偶联(参见Staerz,Uwe D.,Osami Kanagawa,and Michael J.Bevan."Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells."Nature 314.6012(1985):628-631)。多特异性抗体也可以通过交联两种或多种抗体或片段来制备(参见例如,US Patent No.4,676,980,和Brennan,Maureen,Peter F.Davison,and Henry Paulus."Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments."Science 229.4708(1985):81-83),使用亮氨酸拉链来产生双特异性抗体(参见例如Kostelny,Sheri A.,M.S.Cole,and J.Yun Tso."Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers."The Journal of Immunology 148.5(1992):1547-1553.),使用双抗体技术制备双特异性抗体片段(参见例如,Holliger,Philipp,Terence Prospero,and Greg Winter.""Diabodies":small bivalent and bispecific antibody fragments."Proceedings of the National Academy of Sciences 90.14(1993):6444-6448),使用单链Fv(sFv)二聚体(.Gruber,Meegan,et al."Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in Escherichia coli."The Journal of immunology 152.11(1994):5368-5374.),通过所描述制备三特异性抗体(例如,在in Tutt,Alison,G.T.Stevenson,and M.J.Glennie."Trispecific F(ab')3 derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells."The Journal of Immunology 147.1(1991):60-69.),以及根据Labrijn,Aran F.,et al."Efficient generation of stable bispecific IgG1by controlled Fab-arm exchange."Proceedings of the National Academy of Sciences 110.13(2013):5145-5150的受控的Fab臂交换(cFAE)。

[1666] 用于诊断和研究应用的缀合物

[1667] 根据第十九方面的一些第五实施方式,缀合物包含可检测部分。可检测部分的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性材料、正电子发射金属、非放射性顺磁金属离子和反应性部分。可检测物质可以直接或间接偶联或缀合至抗体或其片段,例如,通过本领域已知的接头或另一部分,使用本领域已知的技术。酶标记的实例包括萤光素酶(例如,萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶;US Pat.No.4,737,456)、萤光素、2,3-二

氢酞嗪二酮、苹果酸脱氢酶、脲酶、过氧化物酶如辣根过氧化物酶(HRPO)、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、乙酰胆碱酯酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖类氧化酶(例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(例如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。

[1668] 合适的辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和抗生物素/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的例子包括荧光素酶、荧光素和水母发光蛋白;合适的放射性物质的实例包括125I、131I、111In或99mTc。

[1669] 检测趋化因子受体或CCR8的表达通常涉及将生物样品(个体的肿瘤、细胞、组织或体液)与根据本发明的一种或多种抗体或片段(任选地缀合至可检测部分)接触,并且检测样品是否对趋化因子受体或CCR8呈阳性,或者与对照样品相比样品是否改变了(例如,减少或增加)表达。

[1670] 方面20-药物组合物

[1671] 根据第20方面,提供了包含根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段的药物组合物,或根据第19方面的缀合物。优选地,药物组合物包含治疗有效量的根据本文所述的任何一种实施方式的抗体或其片段或缀合物,或其组合,以及药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。

[1672] 药物组合物可以通过将具有所需纯度的抗体、片段或缀合物与任选的生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来制备(Remington,Joseph Price.Remington:The science and practice of pharmacy.Vol.1.Lippincott Williams&Wilkins,2006)。药物组合物可以是例如冻干制剂或水溶液的形式。

[1673] 载体、赋形剂、稳定剂

[1674] 可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用的剂量和浓度下对接受者无毒,包括缓冲液,例如磷酸盐缓冲液(例如PBS)、柠檬酸盐缓冲液和其他有机酸缓冲液;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或丙基苯甲酸酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(例如少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;聚乙烯吡咯烷酮等亲水性高分子;甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸等氨基酸;单糖、双糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;EDTA等螯合剂;蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇等糖;成盐抗衡离子,例如钠;金属配合物(例如,锌-蛋白质配合物);和/或非离子表面活性剂,例如Tween®、Pluronic®或聚乙二醇(PEG)。

[1675] 多种治疗活性化合物

[1676] 根据本发明,药物组合物可以包含多于一种活性化合物,例如对于正在治疗的特定适应症是必要的或有益的。

[1677] 根据第20方面的一些第一实施方式,药物组合物包含一种或多种另外的治疗活性化合物。

[1678] 在第20方面的第一实施方式的一些优选实施方式中,药物组合物包含根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或第18方面的抗体或抗原结合片段,或根据第19方面的

缀合物,和

[1679] a)针对检查点蛋白的抗体或小分子,例如PD1、PD-L1或CTLA-4,和/或

[1680] b)靶向其他趋化因子受体的抗体,例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1或CXCR1,和/或者

[1681] c)靶向肿瘤细胞特异性表达的蛋白的抗体和/或

[1682] d)靶向HER2和/或EGFR的抗体或小分子,和/或

[1683] e)任何头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌、食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌和/或前列腺癌的标准治疗,和/或

[1684] f)化疗剂,优选地紫杉烷、紫杉醇、多柔比星、顺铂、卡铂、奥沙利铂、紫杉醇或吉西他滨,和/或

[1685] g)靶向激酶抑制剂,例如索拉非尼、瑞戈非尼或MEKi-1。

[1686] 与检查点抑制剂组合

[1687] 根据第20方面的第一实施方式地优选实施方式A,所述药物组合物还包括靶向PD1、PD-L1或CTLA-4等检查点蛋白的抗体或小分子。合适的检查点靶向抗体包括Nivolumab(PD1;人IgG4)、Pembrolizumab(PD1;人源化IgG4)、Atezolizumab(PD-L1;人源化IgG1)、Avelumab(PD-L1;人IgG1)、Durvalumab(PD-L1;人IgG1)、Cemiplimab、cemiplimab-rwlc(PD-1;人mAb)、Dostarlimab(TSR-042)(PD-1;人源化IgG4)或Ipilimumab(CTLA-4;人IgG1)。

[1688] 在一些实施方式中,靶向检查点蛋白的抗体或小分子靶向CTLA-4,PDL1,PDL2,PD1,B7-H3,B7-H4,BTLA,HVEM,TIM3,GAL9,LAG3,VISTA,KIR,2B4,CD160,CGEN-15049,CHK1,CHK2,A2aR,B-7家族配体或其组合。

[1689] 与趋化因子受体抗体组合

[1690] 根据第20方面的第一实施方式的一些优选的实施方式B,药物组合物还包含靶向另外的趋化因子受体的抗体或小分子,例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1或CXCR1。靶向另外的趋化因子受体的合适抗体包括根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面提供的抗体,或Mogamulizumab。

[1691] 与HER2或EGFR靶向抗体或分子的组合

[1692] 根据第20方面的第一实施方式的一些优选的实施方式C,所述药物组合物还包含靶向HER2和/或EGFR的抗体或小分子。靶向HER2的合适抗体是Trastuzumab(HER2;人源化IgG1),Pertuzumab(HER2;人源化IgG1),Ado-trastuzumab emtansine(HER2;人源化IgG1;ADC),[fam-]trastuzumab deruxtecan,fam-trastuzumab deruxtecan-nxki(HER2;人源化IgG1ADC),Sacituzumab govitecan;sacituzumab govitecan-hziy(TROP-2;人源化IgG1ADC)和/或Margetuximab(HER2;嵌合IgG1).合适的靶向EGFR的抗体是Cetuximab(EGFR;嵌合IgG1),Panitumumab(EGFR;人IgG2),和Necitumumab(EGFR;人IgG1)。

[1693] 与治疗性抗体的组合

[1694] 根据第20方面的第一实施方式的一些实施方式D,药物组合物包含选自以下的另外的治疗性抗体:Muromonab-CD3(CD3;鼠IgG2a),Efalizumab(CD11a;人源化IgG1),Tositumomab-I131(CD20;鼠IgG2a),Nebacumab(Endotoxin;人IgM),Edrecolomab(EpCAM;

鼠IgG2a),Catumaxomab(EPCAM/CD3;大鼠/小鼠双特异性mAb),Daclizumab(IL-2R;人源化IgG1),Abciximab(GPIIb/IIIa;嵌合IgG1 Fab),Rituximab(CD20;嵌合IgG1),Basiliximab(IL-2R;嵌合IgG1),Palivizumab(RSV;人源化IgG1),Infliximab(TNF;嵌合IgG1),Trastuzumab(HER2;人源化IgG1),Adalimumab(TNF;人IgG1),Ibritumomab tiuxetan(CD20;鼠IgG1),Omalizumab(IgE;人源化IgG1),Cetuximab(EGFR;嵌合IgG1),Bevacizumab(VEGF;人源化IgG1),Natalizumab(a4 integrin;人源化IgG4),Panitumumab(EGFR;人IgG2),Ranibizumab(VEGF;人源化IgG1 Fab),Eculizumab(C5;人源化IgG2/4),Certolizumab pegol(TNF;人源化Fab,聚乙二醇化),Ustekinumab(IL-12/23;人IgG1),Canakinumab(IL-1β;人IgG1),Golimumab(TNF;人IgG1),Ofatumumab(CD20;人IgG1),Tocilizumab(IL-6R;人源化IgG1),Denosumab(RANK-L;人IgG2),Belimumab(BLyS;人IgG1),Ipilimumab(CTLA-4;人IgG1),Brentuximab vedotin(CD30;嵌合IgG1;ADC),Pertuzumab(HER2;人源化IgG1),Ado-trastuzumab emtansine(HER2;人源化IgG1;ADC),Raxibacumab(B.anthrasis PA;人IgG1),Obinutuzumab(CD20;人源化IgG1 Glycoengineered),Siltuximab(IL-6;嵌合IgG1),Ramucirumab(VEGFR2;人IgG1),Vedolizumab(α4β7 integrin;人源化IgG1),Nivolumab(PD1;人IgG4),Pembrolizumab(PD1;人源化IgG4),Blinatumomab(CD19,CD3;鼠双特异性串联scFv),Alemtuzumab(CD52;人源化IgG1),Evolocumab(PCSK9;人IgG2),Idarucizumab(Dabigatran;人源化Fab),Necitumumab(EGFR;人IgG1),Dinutuximab(GD2;嵌合IgG1),Secukinumab(IL-17a;人IgG1),Mepolizumab(IL-5;人源化IgG1),Alirocumab(PCSK9;人IgG1),Daratumumab(CD38;人IgG1),Elotuzumab(SLAMF7;人源化IgG1),Ixekizumab(IL-17a;人源化IgG4),Reslizumab(IL-5;人源化IgG4),Olaratumab(PDGFRα;人IgG1),Bezlotoxumab(艰难梭菌肠毒素B;人IgG1),Atezolizumab(PD-L1;人源化IgG1),Obiltoxaximab(B.anthrasis PA;嵌合IgG1),Brodalumab(IL-17R;人IgG2),Dupilumab(IL-4Rα;人IgG4),Inotuzumab ozogamicin(CD22;人源化IgG4;ADC),Guselkumab(IL-23p19;人IgG1),Sarilumab(IL-6R;人IgG1),Avelumab(PD-L1;人IgG1),Emicizumab(Factor Ixa,X;人源化IgG4,bispecific),Ocrelizumab(CD20;人源化IgG1),Benralizumab(IL-5Rα;人源化IgG1),Durvalumab(PD-L1;人IgG1),Gemtuzumab ozogamicin(CD33;人源化IgG4;ADC),Erenumab,erenumab-aooe(CGRP receptor;人IgG2),Galcanezumab,galcanezumab-gnlm(CGRP;人源化IgG4),Burosumab,burosumab-twza(FGF23;人IgG1),Lanadelumab,lanadelumab-flyo(Plasma kallikrelin;人IgG1),Mogamulizumab,mogamulizumab-kpkc(CCR4;人源化IgG1),Tildrakizumab;tildrakizumab-asmn(IL-23p19;人源化IgG1),Fremanezumab,fremanezumab-vfrm(CGRP;人源化IgG2),Ravulizumab,ravulizumab-cwvz(C5;人源化IgG2/4),Cemiplimab,cemiplimab-rwlc(PD-1;人mAb),Ibalizumab,ibalizumab-uiyk(CD4;人源化IgG4),Emapalumab,emapalumab-lzsg(IFNg;人IgG1),Moxetumomab pasudotox,moxetumomab pasudotox-tdfk(CD22;鼠IgG1 dsFv免疫毒素),Caplacizumab,caplacizumab-yhdp(von Willebrand因子;人源化纳米抗体),Risankizumab,risankizumab-rzaa(IL-23p19;人源化IgG1),Polatuzumab vedotin,polatuzumab vedotin-piiq(CD79b;人源化IgG1 ADC),Romosozumab,romosozumab-aqqg(Sclerostin;人源化IgG2),Brolucizumab,brolucizumab-dbll(VEGF-A;人源化scFv),Crizanlizumab;

crizanlizumab-tmca(CD62(aka P-selectin);人源化IgG2),Enfortumab vedotin,enfortumab vedotin-ejfv(Nectin-4;人IgG1 ADC),[fam-]trastuzumab deruxtecan,fam-trastuzumab deruxtecan-nxki(HER2;人源化IgG1 ADC),Teprotumumab,teprotumumab-trbw(IGF-1R;人IgG1),Eptinezumab,eptinezumab-jjmr(CGRP;人源化IgG1),Isatuximab,isatuximab-irfc(CD38;嵌合IgG1),Sacituzumab govitecan;sacituzumab govitecan-hziy(TROP-2;人源化IgG1 ADC),Inebilizumab(CD19;人源化IgG1),Leronlimab(CCR5;人源化IgG4),Satralizumab(IL-6R;人源化IgG2),Narsoplimab(MASP-2,人IgG4),Tafasitamab(CD19;人源化IgG1),REGNEB3(Ebola病毒;mixture of 3个人IgG1的混合),Naxitamab(GD2;人源化IgG1),Oportuzumab monatox(EpCAM;人源化scFv免疫毒素),Belantamab mafodotin(B-cell成熟抗原;人源化IgG1 ADC),Margetuximab(HER2;嵌合IgG1),Tanezumab(神经生长因子;人源化IgG2),Dostarlimab(TSR-042)(PD-1;人源化IgG4),Teplizumab(CD3;人源化IgG1),Aducanumab(β淀粉样蛋白;人IgG1),Sutimlimab(BIVV009)(C1s;人源化IgG4),Evinacumab(血管生成素样3;人IgG4)。

[1695] 与细胞毒性剂或细胞生长抑制剂的组合

[1696] 根据第20方面的第一实施方式E,药物组合物还包含选自以下的细胞生长抑制剂和/或细胞毒性剂:放射性核素、烷化剂、DNA交联剂、DNA嵌入剂(例如,沟结合剂如小沟结合剂)、细胞周期调节剂、细胞凋亡调节剂、激酶抑制剂、蛋白质合成抑制剂、线粒体抑制剂、核输出抑制剂、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、RNA/DNA抗代谢物和抗有丝分裂剂,如第19方面的第二实施方式所述。

[1697] 在一些优选的实施方式中,细胞毒性剂是auristatin、美登木素生物碱、驱动蛋白-纺锤体蛋白(KSP)抑制剂、烟酰胺磷酸核糖基转移酶(NAMPT)抑制剂或吡咯并苯二氮䓬衍生物。

[1698] 方面21-药物用途/治疗方法

[1699] 根据第21方面,提供了根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段,或根据第19方面的缀合物或根据第20方面的药物组合物用作药物。

[1700] 此外,提供了提供了根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段,或根据第19方面的缀合物或根据第20方面的药物组合物用于制备药物的用途,例如用于治疗涉及表达趋化因子受体特别是CCR8的细胞的肿瘤或疾病。

[1701] 此外,提供了一种治疗疾病的方法,所述方法包括施用有效剂量的根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段、或根据第19方面的缀合物或根据第20方面的药物组合物给有需要的患者。

[1702] 对于治疗应用,可以将根据本发明的抗体或抗原结合片段或缀合物或药物组合物施用于患者或受试者,例如以药学上可接受的剂型向人类或非人类受试者施用。例如,可以通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径以大丸剂形式静脉内给药或通过在一段时间内连续输注。根据本发明的抗体、片段、缀合物和药物组合物特别适合通过瘤内、瘤周、病灶内或病灶周围途径施用,以发挥局部和全身治疗效果。

[1703] 可能的施用途径包括肠胃外(例如,肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下)、肺内和鼻内。此外,抗体、片段、缀合物和药物组合物可以通过脉冲输注施用,例如抗体、片段或

缀合物的剂量递减。优选地，通过注射给药，最优选地静脉内或皮下注射，这部分取决于施用是短暂的还是长期的。施用的量可能取决于多种因素，例如患者或受试者的临床症状、体重，以及是否施用其他药物。本领域技术人员将认识到施用途径将根据待治疗的病症或疾病而变化。

[1704] 抗体的给药频率范围从每3-6个月一次到每周、每两周(BIW)或每天给药一次。同样地，剂量水平范围从低mg固定剂量(每天、每周、每两周或每月，取决于抗体)到大约1g剂量。给药频率取决于多种因素，包括靶标的浓度和周转率、靶标的生物分布、抗体、片段或缀合物的半衰期以及可能增强抗体、片段、缀合物生物学效应的潜在药效学效应和超出其在药理学相关水平的存在的药物组合物。

[1705] 在一些实施方式中，抗CCR8抗体以1mg/kg的剂量施用，例如每日、每周、q2w、q3w或q4w。在一些实施方式中，抗CCR8抗体的施用剂量为1至30mg/kg，优选地5至10mg/kg，例如每日、每周、q2w、q3w或q4w。在一些实施方式中，抗CCR8抗体的施用剂量为4至8mg/kg，优选地5至6mg/kg，例如每日、每周、q2w、q3w或q4w。

[1706] 为了预防或治疗疾病，抗体的合适剂量将取决于待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和病程、抗体是出于预防目的还是治疗目的而施用、既往治疗、受试者的临床病史和对抗体变体的反应，以及主治医师或健康兽医专业人员的判断。一次或在一系列治疗中适当地向受试者施用抗体。

[1707] 如实施例12.4.2所示，令人惊奇地观察到，即使是单剂量也可能足以建立显著的治疗反应。根据本发明，因此提供了用于治疗肿瘤的诱导ADCC和/或ADCP的抗CCR8抗体，由此仅向受试者施用单剂量的抗CCR8抗体，使得没有向受试者施用更多剂量的相同或不同的抗CCR8抗体。这种方法不仅在逻辑上优越并且对患者特别方便，而且还避免了患者依从性问题。

[1708] 当静脉内施用时，包含抗体、片段或缀合物的药物组合物可以通过输注施用约0.5至约5小时的时间。在一些实施方式中，输注可能会持续约0.5至约2.5小时、约0.5至约2.0小时、约0.5至约1.5小时或约1.5小时，这取决于根据所施用的抗体、片段、缀合物和药物组合物以及所施用的抗体、片段或缀合物的量。

[1709] 方面22-二次医药用途/治疗方法

[1710] 用根据本发明的抗CCR8抗体治疗在各种同基因肿瘤模型中显示出显著的功效。在一些情况下，将有效剂量的抗体或抗原结合片段施用于一组患病受试者导致

[1711] a.至少15％、20％或25％的受试者有完全响应，和/或

[1712] b.至少40％、50％、60％或70％的受试者的总体响应率。

[1713] 根据第22方面，提供了根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段，或根据第19方面的缀合物或根据第20方面的药物组合物用于治疗以趋化因子受体阳性细胞为特征的肿瘤或疾病，优选CCR8阳性细胞，例如CCR8阳性调节性T细胞。治疗可以如方面21所讨论的那样发生。

[1714] 优选地，提供了根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段，或根据第19方面的缀合物或根据第20方面的药物组合物用于治疗肿瘤或疾病，其特征在于涉及表达靶向的七次跨膜受体或趋化因子受体的细胞。

[1715] 对于根据本发明的抗体、抗原结合片段或缀合物，可以设想多种作用模式。一种作

用模式是将本发明的抗趋化因子受体抗体与药物偶联成为抗体药物缀合物(ADC)形式。另一种作用方式是抗体靶向趋化因子受体诱导ADCC的能力。第三种作用模式在于抗体靶向趋化因子受体诱导ADCP的能力。

[1716] 特定的根据第8、第11、第12、第13和第14方面的特定CCR8抗体或抗原结合片段特别适用于基于ADCC/ADCP的方法,例如因为它们的特点是内化特别低或者是非内化抗体,因此驻留在表达CCR8的靶细胞表面并引起它们的有效杀伤,如体外激活的人Tregs所证明的(实施例10.3.3 ff,实施例10.3.4 ff)或体内(实施例12 ff)。

[1717] 调节性T细胞(Treg)通过抑制效应T细胞(包括肿瘤微环境中的肿瘤反应性T细胞)的功能来促进肿瘤生长。事实上,Treg是阻碍免疫检查点抑制剂(ICI)在许多适应症中发挥功效的关键耐药机制之一。

[1718] CCR8是趋化因子受体GPCR家族的一种表面受体,主要表达在肿瘤中常见的激活免疫抑制性Treg上。与针对这些抑制性T细胞的其他方法不同,靶向CCR8提供了在不影响静息Treg或其他全身免疫细胞的情况下耗尽肿瘤内Treg的机会。因此,靶向CCR8可能在疗效和安全性方面都更胜一筹。因此,这种作用模式可用于具有肿瘤内Tregs的肿瘤,但也可用于其他以激活异常存在即CCR8表达的Tregs为特征的疾病。

[1719] 具体适应症

[1720] 原则上,抗体、片段、缀合物和药物组合物可用于治疗涉及CCR8表达细胞的任何癌症。例如,癌症可包括表达CCR8的肿瘤细胞,例如B细胞淋巴瘤和T细胞淋巴瘤。或者,癌症可包含表达CCR8的肿瘤内Treg。如实施例11所示,CCR8在多种肿瘤适应症中上调,例如T细胞急性淋巴细胞白血病、乳腺癌、三阴性乳腺癌、三阳性乳腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌癌症(SCLC)、睾丸癌、胃癌、头颈部鳞状细胞癌、胸腺瘤、食管腺癌、结直肠癌、胰腺癌、卵巢癌或宫颈癌、急性髓系白血病、肾癌、膀胱癌、皮肤癌、黑色素瘤、甲状腺癌、间皮瘤、肉瘤和前列腺癌。根据一些优选的实施方式,作为药物的用途是用于治疗头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌、食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌和/或前列腺癌。

[1721] 根据第22方面的一些第一实施方式,肿瘤选自肾上腺癌(例如肾上腺皮质癌或嗜铬细胞瘤)、膀胱癌(例如移行细胞癌、移行细胞癌-乳头状)、脑癌(例如神经胶质瘤-星形细胞瘤、神经胶质瘤-星形细胞瘤-胶质母细胞瘤、神经胶质瘤-少突星形细胞瘤、神经胶质瘤-少突胶质细胞瘤)、乳腺癌(例如ADC、ADC-导管、ADC-导管-TNBC、ADC-导管-TPBC、ADC-小叶)、结直肠癌(例如ADC)、食管癌(例如ADC)、食管癌(例如SCC)、胃癌(例如ADC、ADC-弥漫性、ADC-肠型、ADC-肠-管状)、头颈癌(例如喉癌-SCC、SCC、口腔癌-SCC)、肾癌(例如ccRCC、嫌色细胞、乳头状、乳头状I型、乳头状II型)、肝癌(例如HCC)、肺癌(例如NSCLC-ADC、NSCLC-ADC-混合型、NSCLC-SCC、SCLC),间皮瘤(例如上皮样)、卵巢癌(例如ADC-囊腺癌-浆液性乳头状癌)、胰腺癌(例如ADC导管)、前列腺癌(例如ADC-腺泡型)、肉瘤(如平滑肌肉瘤、去分化脂肪肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤)、皮肤癌(如黑色素瘤)、睾丸癌(如生殖细胞瘤-精原细胞瘤)、胸腺瘤、甲状腺癌(如滤泡癌、乳头状癌-经典变体)或子宫癌(例如宫颈-SCC、宫颈-SCC-角化、宫颈-SCC-非角化、子宫内膜-ADC-子宫内膜样、子宫内膜-ADC-乳头状浆液性、子宫内膜-癌肉瘤-恶性苗勒管混合瘤)、B细胞淋巴瘤和T细胞淋巴瘤(参见表11.1.2)。

[1722] 根据第22方面的一些第二实施方式,肿瘤选自T细胞急性淋巴细胞白血病、乳腺癌、三阴性乳腺癌、三阳性乳腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、睾丸癌、胃

癌、头颈部鳞状细胞癌、胸腺瘤、食管腺癌、结直肠癌、胰腺癌、卵巢癌或宫颈癌、急性髓性白血病、肾癌、膀胱癌、皮肤癌、皮肤癌、黑色素瘤、甲状腺癌、间皮瘤、肉瘤和前列腺癌或任何其他涉及趋化因子受体或CCR8表达细胞的癌症。优选地，肿瘤选自头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌、食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌和/或前列腺癌。

[1723] 组合治疗

[1724] 根据第22方面的一些第三实施方式，其可以并且被建议与根据第22方面的第一和/或第二实施方式组合，该用途是同时、单独或顺序地与一种或多种其他治疗活性化合物一起使用。实施例12.6、12.6.1、12.6.2、12.6.3、12.6.4、12.6.5、12.6.6、12.6.7、12.6.8和12.6.9中提供了组合治疗的实例，证明了本发明的抗CCR8抗体与一般的抗CCR8抗体组合疗法的广泛的适用性。

[1725] 抗趋化因子受体抗体，例如CCR8抗体或ADC可辅助或与具有抗癌特性的其他药剂或治疗一起使用。当辅助使用时，抗体、片段或缀合物和其他试剂可以一起配制在单个组合药物组合物或制剂中，如第20方面所述，或者可以优选地在单一协调的给药方案或不同的给药方案上单独配制和施用。

[1726] 顺序给药:抗CCR8抗体治疗后的组合伙伴

[1727] 根据本发明发现，抗CCR8抗体作为第一药剂的施用和随后一种或多种其他治疗活性化合物的施用以不可预见的方式增加了功效。

[1728] 根据优选的治疗方案，治疗开始于施用抗CCR8抗体(例如如上所述每天、每周、q2w、q3w或q4w)，随后任选地施用一种或多种另外的治疗活性化合物。如实施例12.6 ff所述，在抗CCR8抗体的初始剂量后开始施用第二治疗剂或疗法与进一步改善的功效相关。不受理论的束缚，应选择初始剂量之间的时间以允许肿瘤内Treg消耗至少30％、40％、50％或60％。一种或多种另外的治疗活性化合物或组合伴侣被建议为为此目的描述的那些中的任何一种。例如，一种或多种另外的治疗活性化合物可以包括检查点抑制剂(例如抗-PD1/抗-PD-L1/抗-CTLA4抗体)、靶向由肿瘤细胞特异性表达的蛋白质的抗体，或本文中描述的化学治疗剂。

[1729] 在不同的实施方式中，治疗以化疗剂的施用开始，之后是抗CCR8抗体的施用(例如每周一次或每两周一次的时间表)。

[1730] 用于组合治疗的其他治疗活性化合物

[1731] 与抗趋化因子受体抗体或ADC(例如抗CCR8抗体或ADC)辅助施用的药剂可能与抗趋化因子受体抗体或ADC具有互补活性，因此抗体/ADC和其他药物不会相互产生不利影响。可与根据本发明的抗趋化因子受体或抗CCR8抗体或ADC辅助使用的药剂可以是烷化剂、血管生成抑制剂、抗体、抗代谢剂、抗有丝分裂剂、抗增殖剂、抗病毒剂、极光激酶抑制剂、凋亡促进剂(例如，Bcl-2家族抑制剂)、死亡受体通路激活剂、Bcr-Abl激酶抑制剂、BiTE(双特异性T细胞接合剂)抗体、抗体药物缀合物、生物反应调节剂、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂、细胞周期抑制剂，环氧合酶2抑制剂、DVD、白血病病毒致癌基因同系物(ErbB2)受体抑制剂、生长因子抑制剂、热休克蛋白(HSP)-90抑制剂、组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂、激素疗法、免疫学、凋亡蛋白抑制剂(IAPs)的抑制剂、嵌入抗生素、激酶抑制剂、驱动蛋白抑制剂、Jak2抑制剂、哺乳动物雷帕霉素靶标抑制剂、microRNA、有丝分裂原激活的细胞外信号调节激酶抑制剂、多价结合蛋白、非甾体类抗炎药(NSAID)、聚ADP(二磷酸腺苷)-核糖聚合酶

(PARP)抑制剂、铂化疗药物、马球样激酶(Plk)抑制剂、磷酸肌醇-3激酶(PI3K)抑制剂、蛋白酶体抑制剂、嘌呤类似物、嘧啶类似物、受体酪氨酸激酶抑制剂、维甲酸/三角肌植物生物碱、抑制性小核糖核酸(siRNA)、拓扑异构酶抑制剂、泛素连接酶抑制剂等,以及这些药剂中的一种或多种的组合。

[1732] 根据第22方面的第三实施方式的一些高度优选的实施方式,提供了根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段,或根据第19方面的缀合物或根据第20方面的药物组合物用于与以下同时、分开或依次组合

[1733] (i)一种或多种另外的治疗活性化合物,优选地选自

[1734] a)靶向检查点蛋白的抗体或小分子,例如PD1、PD-L1或CTLA-4,

[1735] b)靶向其他趋化因子受体的抗体,例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1或CXCR1,

[1736] c)靶向肿瘤细胞特异性表达的蛋白的抗体,

[1737] d)靶向HER2和/或EGFR的抗体或小分子,

[1738] e)任何头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌、食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌和/或前列腺癌的标准治疗,和/或

[1739] f)化疗剂,优选紫杉烷、紫杉醇、多柔比星、顺铂、卡铂、奥沙利铂或吉西他滨,

[1740] g)靶向激酶抑制剂,例如索拉非尼、瑞戈非尼或MEKi-1,和/或

[1741] (ii)放射治疗,和或

[1742] (iii)肿瘤内B细胞的耗竭,

[1743] 例如在肿瘤或疾病的治疗中,优选地以趋化因子受体阳性细胞为特征,例如CCR8阳性细胞,例如CCR8阳性调节性T细胞。

[1744] 可以选择合适的紫杉烷,例如选自紫杉醇、白蛋白结合型紫杉醇、卡巴他赛或多烯紫杉醇或其衍生物。

[1745] 其中抗CCR8抗体与多柔比星、紫杉烷类、顺铂或卡铂组合的实施方式,其中抗CCR8抗体与trastuzumab或pertuzumab组合的实施方式,和其中抗CCR8抗体与PD-L1抗体如atezolizumab组合的实施方式特别适用于治疗乳腺癌,如IV期乳腺癌。

[1746] 其中抗CCR8抗体与顺式/卡铂、紫杉醇、多烯紫杉醇或吉西他滨组合的实施方式,其中抗CCR8抗体与avastin、EGFR抑制剂(例如Tarceva或Iressa)、ALK抑制剂、ROS抑制剂、BRAF抑制剂或NTRK抑制剂组合的实施方式,和其中抗CCR8抗体与nivolumab、pembrolizumab或atezolizumab或其中任何一种的衍生物组合的实施方式特别适用于治疗NSCLC。

[1747] 其中抗CCR8抗体与nivolumab、pembrolizumab或ipilimumab(CTLA4)、抗IL2抗体或任何这些的衍生物组合的实施方式,其中抗CCR8抗体与BRAF抑制剂或MEK抑制剂组合的实施方式,和其中抗-CCR8抗体联合达卡巴嗪、紫杉醇、卡铂或顺铂组合的实施方式特别适用于黑色素瘤的治疗。

[1748] 与检查点抑制剂的组合

[1749] 如果肿瘤对免疫检查点抑制有响应,或者如果肿瘤显示出高度或中等免疫浸润,并且如果存在大量CD8+ T细胞和/或NK细胞或可以被诱导(例如除了高CCR8/FoxP3比率),则发现肿瘤对抗CCR8抗体治疗特别敏感,(参见实施例12.6 ff,参见响应同基因型模型)。

[1750] 根据第22方面的第三实施方式的一些特别优选的实施方式,所述一种或多种另外的治疗活性化合物包含靶向检查点蛋白例如PD1、PD-L1或CTLA-4的抗体或小分子。合适的检查点靶向抗体包括Nivolumab(PD1;人IgG4)、Pembrolizumab(PD1;人源化IgG4)、Atezolizumab(PD-L1;人源化IgG1)、Avelumab(PD-L1;人IgG1)、Durvalumab(PD-L1;人IgG1)、Cemiplimab、cemiplimab-rwlc(PD-1;人mAb)、Dostarlimab(TSR-042)(PD-1;人源化IgG4)或Ipilimumab(CTLA-4;人IgG1)。在一些实施方式中,靶向检查点蛋白的抗体或小分子靶向CTLA-4,PDL1,PDL2,PD1,B7-H3,B7-H4,BTLA,HVEM,TIM3,GAL9,LAG3,VISTA,KIR,2B4,CD160,CGEN-15049,CHK 1,CHK2,A2aR,B-7家族配体或其组合。实施例12.6 ff显示通过将靶向检查点蛋白PD-L1的抗体与根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的本发明抗体组合获得的优异治疗效果。实施例12.6 ff证明,根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的本发明抗体与靶向检查点蛋白CTLA4的抗体的组合显示在肿瘤模型中同样具有出色的疗效。

[1751] 与趋化因子受体抗体的组合

[1752] 根据第22方面的第三实施方式的一些优选的实施方式B,所述一种或多种另外的治疗活性化合物包含靶向另外的趋化因子受体的抗体或小分子,例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1或CXCR1。靶向另外的趋化因子受体的合适抗体包括根据第6方面提供的抗体,例如CCR5抗体、CXCR5抗体、CCR4抗体、或Mogamulizumab。

[1753] 与HER2或EGFR靶向抗体或分子的组合

[1754] 根据第22方面的第三实施方式的一些优选的实施方式C,所述一种或多种另外的治疗活性化合物包含靶向HER2和/或EGFR的抗体或小分子。靶向HER2的合适抗体是Trastuzumab(HER2;人源化IgG1),Pertuzumab(HER2;人源化IgG1),Ado-trastuzumab emtansine(HER2;人源化IgG1;ADC),[fam-]trastuzumab deruxtecan,fam-trastuzumab deruxtecan-nxki(HER2;人源化IgG1 ADC),Sacituzumab govitecan;sacituzumab govitecan-hziy(TROP_2;人源化IgG1 ADC)和/或Margetuximab(HER2;嵌合IgG1).合适的靶向EGFR的抗体是Cetuximab(EGFR;嵌合IgG1),Panitumumab(EGFR;人IgG2),和Necitumumab(EGFR;人IgG1)。

[1755] 与治疗性抗体的组合

[1756] 根据第22方面的第三实施方式的一些实施方式D,所述一种或多种另外的治疗活性化合物包含选自以下的另外的治疗性抗体:Muromonab-CD3(CD3;鼠IgG2a),Efalizumab(CD11a;人源化IgG1),Tositumomab-I131(CD20;鼠IgG2a),Nebacumab(Endotoxin;人IgM),Edrecolomab(EpCAM;鼠IgG2a),Catumaxomab(EPCAM/CD3;大鼠/小鼠双特异性mAb),Daclizumab(IL-2R;人源化IgG1),Abciximab(GPIIb/IIIa;嵌合IgG1 Fab),Rituximab(CD20;嵌合IgG1),Basiliximab(IL-2R;嵌合IgG1),Palivizumab(RSV;人源化IgG1),Infliximab(TNF;嵌合IgG1),Trastuzumab(HER2;人源化IgG1),Adalimumab(TNF;人IgG1),Ibritumomab tiuxetan(CD20;鼠IgG1),Omalizumab(IgE;人源化IgG1),Cetuximab(EGFR;嵌合IgG1),Bevacizumab(VEGF;人源化IgG1),Natalizumab(a4 integrin;人源化IgG4),Panitumumab(EGFR;人IgG2),Ranibizumab(VEGF;人源化IgG1 Fab),Eculizumab(C5;人源化IgG2/4),Certolizumab pegol(TNF;人源化Fab,聚乙二醇化),Ustekinumab(IL-12/23;

人IgG1),Canakinumab(IL-1β;人IgG1),Golimumab(TNF;人IgG1),Ofatumumab(CD20;人IgG1),Tocilizumab(IL-6R;人源化IgG1),Denosumab(RANK-L;人IgG2),Belimumab(BLyS;人IgG1),Ipilimumab(CTLA-4;人IgG1),Brentuximab vedotin(CD30;嵌合IgG1;ADC),Pertuzumab(HER2;人源化IgG1),Ado-trastuzumab emtansine(HER2;人源化IgG1;ADC),Raxibacumab(B.anthrasis PA;人IgG1),Obinutuzumab(CD20;人源化IgG1 Glycoengineered),Siltuximab(IL-6;嵌合IgG1),Ramucirumab(VEGFR2;人IgG1),Vedolizumab(α4β7 integrin;人源化IgG1),Nivolumab(PD1;人IgG4),Pembrolizumab(PD1;人源化IgG4),Blinatumomab(CD19,CD3;鼠双特异性串联scFv),Alemtuzumab(CD52;人源化IgG1),Evolocumab(PCSK9;人IgG2),Idarucizumab(Dabigatran;人源化Fab),Necitumumab(EGFR;人IgG1),Dinutuximab(GD2;嵌合IgG1),Secukinumab(IL-17a;人IgG1),Mepolizumab(IL-5;人源化IgG1),Alirocumab(PCSK9;人IgG1),Daratumumab(CD38;人IgG1),Elotuzumab(SLAMF7;人源化IgG1),Ixekizumab(IL-17a;人源化IgG4),Reslizumab(IL-5;人源化IgG4),Olaratumab(PDGFRα;人IgG1),Bezlotoxumab(艰难梭菌肠毒素B;人IgG1),Atezolizumab(PD-L1;人源化IgG1),Obiltoxaximab(B.anthrasis PA;嵌合IgG1),Brodalumab(IL-17R;人IgG2),Dupilumab(IL-4Rα;人IgG4),Inotuzumab ozogamicin(CD22;人源化IgG4;ADC),Guselkumab(IL-23p19;人IgG1),Sarilumab(IL-6R;人IgG1),Avelumab(PD-L1;人IgG1),Emicizumab(Factor Ixa,X;人源化IgG4,bispecific),Ocrelizumab(CD20;人源化IgG1),Benralizumab(IL-5Rα;人源化IgG1),Durvalumab(PD-L1;人IgG1),Gemtuzumab ozogamicin(CD33;人源化IgG4;ADC),Erenumab,erenumab-aooe(CGRP receptor;人IgG2),Galcanezumab,galcanezumab-gnlm(CGRP;人源化IgG4),Burosumab,burosumab-twza(FGF23;人IgG1),Lanadelumab,lanadelumab-flyo(Plasma kallikrelin;人IgG1),Mogamulizumab,mogamulizumab-kpkc(CCR4;人源化IgG1),Tildrakizumab;tildrakizumab-asmn(IL-23p19;人源化IgG1),Fremanezumab,fremanezumab-vfrm(CGRP;人源化IgG2),Ravulizumab,ravulizumab-cwvz(C5;人源化IgG2/4),Cemiplimab,cemiplimab-rwlc(PD-1;人mAb),Ibalizumab,ibalizumab-uiyk(CD4;人源化IgG4),Emapalumab,emapalumab-lzsg(IFNg;人IgG1),Moxetumomab pasudotox,moxetumomab pasudotox-tdfk(CD22;鼠IgG1 dsFv免疫毒素),Caplacizumab,caplacizumab-yhdp(Von Willebrand因子;人源化纳米抗体),Risankizumab,risankizumab-rzaa(IL-23p19;人源化IgG1),Polatuzumab vedotin,polatuzumab vedotin-piiq(CD79b;人源化IgG1ADC),Romosozumab,romosozumab-aqqg(Sclerostin;人源化IgG2),Brolucizumab,brolucizumab-dbll(VEGF-A;人源化scFv),Crizanlizumab;crizanlizumab-tmca(CD62(aka P-selectin);人源化IgG2),Enfortumab vedotin,enfortumab vedotin-ejfv(Nectin-4;人IgG1 ADC),[fam-]trastuzumab deruxtecan,fam-trastuzumab deruxtecan-nxki(HER2;人源化IgG1 ADC),Teprotumumab,teprotumumab-trbw(IGF-1R;人IgG1),Eptinezumab,eptinezumab-jjmr(CGRP;人源化IgG1),Isatuximab,isatuximab-irfc(CD38;嵌合IgG1),Sacituzumab govitecan;sacituzumab govitecan-hziy(TROP-2;人源化IgG1 ADC),Inebilizumab(CD19;人源化IgG1),Leronlimab(CCR5;人源化IgG4),Satralizumab(IL-6R;人源化IgG2),Narsoplimab(MASP-2,人IgG4),Tafasitamab(CD19;人源化IgG1),REGNEB3(Ebola病毒;mixture of 3个

人IgG1的混合),Naxitamab(GD2;人源化IgG1),Oportuzumab monatox(EpCAM;人源化scFv免疫毒素),Belantamab mafodotin(B-cell成熟抗原;人源化IgG1 ADC),Margetuximab(HER2;嵌合IgG1),Tanezumab(神经生长因子;人源化IgG2),Dostarlimab(TSR-042)(PD-1;人源化IgG4),Teplizumab(CD3;人源化IgG1),Aducanumab(β淀粉样蛋白;人IgG1),Sutimlimab(BIVV009)(C1s;人源化IgG4),Evinacumab(血管生成素样3;人IgG4)。

[1757] 与任何这些另外治疗性抗体的组合治疗特别优选用于特异性表达所选的另外治疗性抗体的靶标的肿瘤。

[1758] 根据第22方面的第3实施方式的一些实施方式E,一种或多种另外的治疗活性化合物包含靶向CD16a、ILDR2、PSMA或间皮素的另外的治疗性抗体。

[1759] 与细胞毒性或细胞生长抑制剂的组合

[1760] 几种化疗药物如多柔比星和奥沙利铂诱导免疫原性细胞死亡(ICD)。然而,发现ICD与抗CCR8抗体的响应有关,因此组合疗法可以为单一疗法的应用增加更多益处。

[1761] 根据第22方面的第三实施方式的一些实施方式F,一种或多种另外的治疗活性化合物包含选自以下的细胞生长抑制剂:放射性核素、烷化剂、DNA交联剂、DNA嵌入剂(例如,沟结合剂如小沟结合剂)、细胞周期调节剂、细胞凋亡调节剂、激酶抑制剂、蛋白质合成抑制剂、线粒体抑制剂、核输出抑制剂、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、RNA/DNA抗代谢物和抗有丝分裂剂。

[1762] 烷化剂

[1763] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F1,一种或多种另外的治疗活性化合物包含选自以下的烷化剂:asaley(L-亮氨酸,N-[N-乙酰基-4-[双-(2-氯乙基)氨基]-DL苯丙氨酸]-乙酯)的烷基化剂;AZQ(1,4-环己二烯-1,4-二氨基甲酸,2,5-双(1-氮丙啶基)-3,6-二氧代-二乙酯);BCNU(N,N′-双(2-氯乙基)-N-亚硝脲);丁砜(1,4-丁二醇二甲磺酸盐);(羧基邻苯二甲酸)铂;CBDCA(顺-(1,1-环丁烷二羧基)二胺铂(II));CCNU(N-(2-氯乙基)-N′-环己基-N-亚硝脲);CHIP(异丙铂;NSC 256927);氯霉素;氯佐菌素(2-[[[(2-氯乙基)亚硝基氨基]羰基]氨基]-2-脱氧-D-吡喃糖);顺式铂(顺铂);氯介子;氰基吗啉多柔比星;环二酮;二氢半乳糖醇(5,6-二羟基杜洛糖醇);氟多巴((5-[(2-氯乙基)-(2-氟乙基)氨基]-6-甲基-尿嘧啶);庚磺胺;斑蝥酮;吲哚美辛二聚体DGN462;美法仑;甲基CCNU((1-(2-氯乙基)-3-(反-4-甲基环己烷)-1-亚硝基脲);丝裂霉素C;米托唑胺;氮芥((双(2-氯乙基)甲胺盐酸盐);PCNU((1-(2-氯乙基)-3-(2,6-二氧代-3-哌啶基)-1-亚硝基脲));哌嗪烷基化剂(1-(2-氯乙基)-4-(3-氯丙基)-哌嗪盐酸盐);哌嗪二酮;哌嗪(N,N′-双(3-溴丙酰基)哌嗪);博菲霉素(N-甲基丝裂霉素C);螺旋海因芥;特罗西隆(异氰尿酸三缩水甘油酯);四拉丁语;硫代磷酸(N,N′,N″-三-1,2-乙二基硫代磷酰胺);三乙醇胺;尿嘧啶氮芥;Yoshi-864((双(3-甲氧基丙基)胺盐酸盐)。

[1764] DNA烷化样剂

[1765] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F2,一种或多种另外的治疗活性化合物包含选自以下的DNA烷化样剂:顺铂;卡铂;奈达铂;奥沙利铂;沙铂;四硝酸三铂;丙卡巴肼;六甲胺;达卡巴嗪;米唑胺;替莫唑胺。

[1766] 烷基化抗肿瘤剂

[1767] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F3,一种或多种另外的治疗活性

化合物包含选自以下的烷基化抗肿瘤剂:碳醌;卡莫司汀;氯萘嗪;氯脲佐菌素;多卡霉素;异磷酰胺;福莫司汀;葡磷酰胺;洛莫司汀;甘露硫烷;尼莫司汀;菲铂;溴溴索;雷尼莫司汀;司马司汀;链脲佐菌素;硫特帕;硫丹;三亚醌;三乙烯三聚氰胺;三铂四硝酸盐。

[1768] DNA复制和修复抑制剂

[1769] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F4,一种或多种另外的治疗活性化合物包含选自以下的DNA复制和修复抑制剂:六甲糖胺;博来霉素;达卡巴嗪;更生霉素;米托布罗糖醇;丝裂霉素;平阳霉素;普霉素;丙卡巴肼;替莫唑胺;ABT-888(veliparib);奥拉帕尼;KU-59436;AZD-2281;AG-014699;BSI-201;BGP-15;INO-1001;ONO-2231。

[1770] 细胞周期调节剂

[1771] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F5,一种或多种另外的治疗活性化合物包含细胞周期调节剂,例如紫杉醇;Nab-紫杉醇;多烯紫杉醇;长春新碱;长春碱;ABT-348;AZD-1152;MLN-8054;VX-680;Aurora A特异性激酶抑制剂;Aurora B特异性激酶抑制剂和泛Aurora激酶抑制剂;AZD-5438;BMI-1040;BMS-032;BMS-387;CVT-2584;黄酮吡啶醇;GPC-286199;MCS-5A;PD0332991;PHA-690509;seliciclib(CYC-202,R-roscovitines);ZK-304709;AZD4877,ARRY-520;GSK923295A。

[1772] 细胞凋亡调节剂

[1773] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F6,一种或多种另外的治疗活性化合物包含细胞凋亡调节剂,例如AT-101((-)棉酚);G3139或oblimersen(Bcl-2靶向反义寡核苷酸);IPI-194;IPI-565;N-(4-(4-((4′-氯(1,1′-联苯)-2-基)甲基)哌嗪-1-基苯甲酰基)-4-(((1R)-3-(二甲基氨基)-1-((苯硫基)甲基)丙基)氨基)-3-硝基苯磺酰胺;N-(4-(4-((2-(4-氯苯基)-5,5-二甲基-1-环己-1-en-1-基)甲基)哌嗪-1-基)苯甲酰基)-4-(((1R)-3-(吗啉-4-基)-1-((苯硫基)甲基)丙基)氨基)-3-((三氟甲基)磺酰基)苯磺酰胺;GX-070(Obatoclax®;1H-吲哚,2-(2-((3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基)亚甲基)-3-甲氧基-2H-吡咯-5-基)-));HGS1029;GDC-0145;GDC-0152;LCL-161;LBW-242;维奈托克;靶向TRAIL或死亡受体(例如DR4和DR5)的药物,例如ETR2-ST01、GDC0145、HGS-1029、LBY-135、PRO-1762;靶向半胱天冬酶、半胱天冬酶调节剂、BCL-2家族成员、死亡结构域蛋白、TNF家族成员、Toll家族成员和/或NF-kappa-B蛋白的药物。

[1774] 血管生成抑制剂

[1775] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F7,一种或多种另外的治疗活性化合物包含血管生成抑制剂,例如ABT-869;AEE-788;阿昔替尼(AG-13736);AZD-2171;CP-547,632;IM-862;pegaptamib;索拉非尼;BAY43-9006;帕唑帕尼(GW-786034);vatalanib(PTK-787,ZK-222584);舒尼替尼;SU-11248;VEGF陷阱(trap);凡德他尼;ABT-165;ZD-6474;DLL4抑制剂。

[1776] 蛋白酶体抑制剂

[1777] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F8,一种或多种另外的治疗活性化合物包含蛋白酶体抑制剂,例如硼替佐米;卡非佐米;环氧霉素;伊沙佐米;盐孢菌胺A。

[1778] 激酶抑制剂

[1779] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F9,一种或多种另外的治疗活性化合物包含激酶抑制剂,例如阿法替尼;阿昔替尼;博舒替尼;克唑替尼;达沙替尼;厄洛替

尼;福斯塔替尼;吉非替尼;依鲁替尼;伊马替尼;拉帕替尼;乐伐替尼;穆布替尼;尼洛替尼;帕唑帕尼;培加他尼;索拉非尼;舒尼替尼;SU6656;凡德他尼;维罗非尼;CEP-701(来沙替尼);XL019;INCB018424(卢索替尼);ARRY-142886(塞来替尼);ARRY-438162(比尼美替尼);PD-325901;PD-98059;AP-23573;CCI-779;依维莫司;RAD-001;雷帕霉素;替西罗莫司;ATP竞争性TORC1/TORC2抑制剂,包括PI-103,PP242,PP30,Torin 1;LY294002;XL-147;CAL-120;ONC--21;AEZS--127;ETP--45658;PX--866;GDC--0941;BGT226;BEZ235;XL765,雷戈拉非尼和MEKi-1。

[1780] 蛋白质合成抑制剂

[1781] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F10,一种或多种另外的治疗活性化合物包含蛋白质合成抑制剂,例如链霉素;双氢链霉素;新霉素;弗拉霉素;巴龙霉素;核糖霉素;卡那霉素;阿米卡星;阿贝卡星;贝卡那霉素;地贝卡星;妥布霉素;壮观霉素;潮霉素B;巴龙霉素;庆大霉素;奈替米星;西索米星;异帕米星;虫草霉素;星霉素;四环素;强力霉素;氯四环素;氯霉素;去甲金霉素;赖甲环素;甲氧环素;甲环素;米诺环素;土霉素;青霉环素;罗利四环素;四环素;甘氨酰环素;替加环素;恶唑烷酮类;哌唑酯;利奈唑胺;苯唑胺;雷地唑胺;兰贝唑胺;舒特唑胺;泰地唑胺;肽基转移酶抑制剂;氯霉素;阿齐达米考;甲砜霉素;氟苯尼考;侧耳素;瑞他莫林;泰妙菌素;沃尼穆林;阿奇霉素;克拉霉素;地红霉素;红霉素;氟红霉素;交沙霉素;麦迪霉素;米卡霉素;竹桃霉素;罗他霉素;罗红霉素;螺旋霉素;醋竹桃霉素;泰乐菌素;酮内酯;泰利霉素;赛红霉素;索利霉素;克林霉素;林可霉素;吡利霉素;链霉素;原始霉素;奎奴普汀/达福普汀;弗吉尼亚霉素。

[1782] 组蛋白去乙酰化酶抑制剂

[1783] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F11,一种或多种另外的治疗活性化合物包含组蛋白去乙酰化酶抑制剂,例如伏立诺他;罗米地辛;西达本胺;帕比司他;丙戊酸;贝利司他;莫西司他;abexinostat;恩替司他;SB939(pracinostat);瑞米司他;吉维司他;奎辛司他;硫脲基丁腈(Kevetrin™);CUDC-10;CHR-2845(替非司他);CHR-3996;4SC-202;CG200745;ACY-1215(罗西林司他);ME-344;萝卜硫素。

[1784] 拓扑异构酶I抑制剂

[1785] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F12,一种或多种另外的治疗活性化合物包含拓扑异构酶I抑制剂,例如喜树碱;各种喜树碱衍生物和类似物(例如,NSC 100880,NSC 603071,NSC 107124,NSC 643833,NSC 629971,NSC 295500,NSC 249910,NSC 606985,NSC 74028,NSC 176323,NSC 295501,NSC 606172,NSC 606173,NSC 610458,NSC 618939,NSC 610457,NSC 610459,NSC 606499,NSC 610456,NSC 364830,and NSC 606497);吗啉异柔比星;SN-38。

[1786] 拓扑异构酶II抑制剂

[1787] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F13,一种或多种另外的治疗活性化合物包含拓扑异构酶II抑制剂,例如多柔比星;amonafide(苯并异喹啉二酮);m-AMSA(4′-(9-吖啶基氨基)-3′-甲氧基甲磺酰苯胺);蒽吡唑衍生物((NSC 355644);依托泊苷(VP-16);吡唑并吖啶((吡唑并[3,4,5-kl]吖啶-2(6H)-丙胺,9-甲氧基-N,N-二甲基-5-硝基-,单甲磺酸盐);盐酸比生群;柔红霉素;脱氧阿霉素;米托蒽醌;美诺加林;N,N-二苄柔红霉素;奥蒽唑;鲁必达宗;替尼泊苷。

[1788] DNA嵌入剂

[1789] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F14，一种或多种另外的治疗活性化合物包含DNA嵌入剂，例如蒽霉素；奇霉素A；托马霉素；DC-81；西布罗霉素；吡咯并二氮杂吡啶衍生物；SGD-1882((S)-2-(4-氨基苯基)-7-甲氧基-8-(3S)-7-乙氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11-二氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂辛-8-基)氧基)丙氧基)-1H苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]氮杂辛-5(11aH)-酮)；SG2000(SJG-136；(11a S,11a′S)-8,8′-(丙烷-1,3-二基双(氧基))双(7-甲氧基-2-亚甲基-2,3-二氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂-5(11aH)-酮))。

[1790] RNA/DNA抗代谢物

[1791] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F15，一种或多种另外的治疗活性化合物包含吉西他滨；L-腺苷；5-氮杂胞苷；5-氟尿嘧啶；阿西维素；氨基蝶呤衍生物N-[2-氯-5[[(2,4-二氨基-5-甲基-6-喹唑啉基)甲基]氨基]苯甲酰基]L-天冬氨酸(NSC 132483)；氨基蝶呤衍生物N-[4-[[(2,4-二氨基-5-乙基-6-喹唑啉基)甲基]氨基]苯甲酰基]L-天冬氨酸；氨基蝶呤衍生物N-[2-氯-4-[[(2,4-二氨基-6-蝶啶基)甲基]氨基]苯甲酰基]L-天冬氨酸一水合物；抗叶酸剂PT523((Nα-(4-氨基-4-脱氧蝶酰基)-Nγ-半邻苯二甲酰基-L-鸟氨酸))；Baker的可溶性抗叶酸(NSC 139105)；二氯烯丙基劳松((2-(3,3-二氯烯基)-3-羟基-1,4-萘醌)；布雷奎纳；氟替呋((前药；5-氟-1-(四氢-2-呋喃基)-尿嘧啶)；5,6-二氢-5-氮杂胞苷；甲氨蝶呤；甲氨蝶呤衍生物(N-[[4-[[(2,4-二氨基-6-蝶啶基)甲基]甲基氨基]-1-萘基]羰基]-L-谷氨酸)；PALA((N-(膦酰基)-L-天冬氨酸)；吡唑福林；甲氨蝶呤。

[1792] DNA抗代谢物

[1793] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F16，一种或多种另外的治疗活性化合物包含DNA抗代谢物，例如3-HP；2′-脱氧-5-氟尿苷；5-HP；α-TGDR(α-2′-脱氧6-硫鸟苷)；阿非迪霉素甘氨酸盐；ara C(阿糖胞苷)；5-aza-2′-脱氧胞苷；β-TGDR(β-2′-脱氧6-硫鸟苷)；环胞苷；胍唑；羟基脲；肌苷糖二醛；麦克菌素II；吡唑并咪唑；硫鸟嘌呤；硫嘌呤。

[1794] 线粒体抑制剂

[1795] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F17，一种或多种另外的治疗活性化合物包含线粒体抑制剂，例如胰酶抑素；苯潘他汀；罗丹明-123；雪草碱；d-α-生育酚琥珀酸酯；化合物11β；阿司匹林；椭圆菌素；黄连素；天青素；GX015-070(Obatoclax®；1H-吲哚,2-(2-((3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基)亚甲基)-3-甲氧基-2H-吡咯-5-基)-)；雷公藤酚(雷公藤碱)；二甲双胍；亮绿色；ME-344。

[1796] 抗有丝分裂剂

[1797] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F18，一种或多种另外的治疗活性化合物包含抗有丝分裂剂，例如别秋水仙碱；auristatin，例如MMAE(单甲基auristatin E)和MMAF(单甲基auristatin F)；软海绵素B；西马多汀；秋水仙碱；秋水仙碱衍生物(N-苯甲酰-脱乙酰基苯甲酰胺)；海兔毒素10；海兔毒素15；美登素；美登木素生物碱，例如DM1(N2′-脱乙酰基-N2′-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素)；罗佐辛；紫杉醇；紫杉醇衍生物((2′-N-[3-(二甲基氨基)丙基]戊二酸紫杉醇)；多烯紫杉醇；硫秋水仙碱；三苯甲基半胱氨酸；硫酸长春碱；硫酸长春新碱。

[1798] 核输出抑制剂

[1799] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F19，一种或多种另外的治疗活性化合物包含核输出抑制剂，例如callystatin A；内酯霉素；KPT-185(丙-2-基(Z)-3-[3-[3-甲氧基-5-(三氟甲基)苯基]-1,2,4-三唑-1-基]丙-2-烯酸酯)；卡苏霉素A；瘦素；钩端呋喃A；来普霉素B；拉贾酮；Verdinexor((Z)-3-[3-[3,5-双(三氟甲基)苯基]-1,2,4-三唑-1-基]-N-吡啶-2-基丙基-2-烯酰肼)。

[1800] 激素治疗剂

[1801] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式F20，一种或多种另外的治疗活性化合物包含激素治疗剂，例如阿那曲唑；依西美坦；阿佐昔芬；比卡鲁胺；西曲瑞克；地加瑞克；地洛瑞林；三氯烷；地塞米松；氟他胺；雷洛昔芬；法莫唑；托瑞米芬；氟维司群；来曲唑；福美坦；糖皮质激素；阿霉素；司维拉姆碳酸盐；拉索昔芬；醋酸亮丙瑞林；甲地孕酮；米非司酮；尼鲁米特；柠檬酸他莫昔芬；阿巴瑞克；强的松；非那雄胺；利洛司坦；布舍瑞林；促黄体激素释放激素(LHRH)；组胺；曲洛司坦或莫德拉斯坦；佛瑞林；戈舍瑞林。

[1802] 根据第22方面的第三实施方案的一些实施方式G，一种或多种另外的治疗活性化合物包含靶向骨髓抑制细胞的抗体。

[1803] 根据第22方面的第三个实施方案的一些实施方式H，一种或多种另外的治疗活性化合物包含引发抗原呈递细胞(APC)的试剂，APC又可以激活T细胞。

[1804] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式I，一种或多种另外的治疗活性化合物包含BiTE抗体。BiTE抗体是双特异性抗体，可通过同时结合两种细胞来引导T细胞攻击癌细胞。然后T细胞攻击靶细胞，即Treg。例如，BiTE方法是对基于ADCC的裸露CCR8抗体方法的补充。

[1805] 标准疗法

[1806] 根据第22方面的第三个实施方式的一些实施方式J，该组合是与以趋化因子受体阳性(例如CCR8阳性细胞)为特征的肿瘤或疾病的标准治疗的组合。该标准治疗可以是用于以下任一种的标准治疗：T细胞急性淋巴细胞白血病、乳腺癌、三阴性乳腺癌、三阳性乳腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、睾丸癌、胃癌、头颈部鳞状细胞癌、胸腺瘤、食管腺癌、结直肠癌、胰腺癌、卵巢癌或宫颈癌、急性髓性白血病、肾癌、膀胱癌、黑色素瘤、甲状腺癌、间皮瘤、肉瘤和前列腺癌。

[1807] 根据一些优选的实施方式，标准治疗是用于治疗头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌、食管肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌和/或前列腺癌的标准治疗。如有疑问，标准治疗定义为相应肿瘤的"S3 Leitlinie"，例如，肛门癌、光化性角化病和皮肤鳞状细胞癌、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、子宫内膜癌、滤泡性淋巴瘤、膀胱癌、皮肤癌预防、肝细胞癌(HCC)、睾丸肿瘤、霍奇金淋巴瘤、结直肠癌、喉癌癌、肺癌、胃癌、乳腺癌、黑色素瘤、口腔癌、肾细胞癌、卵巢癌、食道癌、姑息治疗、胰腺癌、阴茎癌、前列腺癌、心理肿瘤学、支持疗法、宫颈癌，于2020-06-26生效，cf.https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/，于2021年1月6日的全部内容通过引用并入本文。

[1808] 放射疗法

[1809] 根据第22方面的第三实施方式的一些实施方式K，其可以并且被建议与根据第22方面的第一和/或第二实施方式的实施方式组合，该用途是与放射疗法同时的、分开、或顺

序组合使用。

[1810] 例如,放射疗法可以是涉及本领域已知的放射方案的疗法,例如包括通过X射线进行的外照射治疗,典型总剂量为40Gy,分为15次每日治疗,或总剂量为70Gy,分为37次每日治疗。例如,放射疗法可以是近距离放射疗法。实施例12.6.8显示了抗CCR8抗体和放疗的组合治疗。

[1811] NK细胞疗法

[1812] 根据第22方面的第三实施方式的一些实施方式L,其可以并且被建议与根据第22方面的第一和/或第二实施方式的实施方式组合,该用途是与NK细胞疗法同时、分开、或顺序组合使用。例如,NK细胞疗法可以包括使用EP1771471中描述的工程化NK细胞系,或者可以包括使用分离的原代NK细胞,可能包括嵌合受体等修饰,参见WO2006052534。

[1813] 靶向与T细胞激活相关的细胞表面分子

[1814] 根据第22方面的第三实施方式的一些实施方式M,提供了根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面,或根据第19方面的缀合物或根据第20方面的药物组合物,用于与靶向与T细胞激活相关的细胞表面分子的一种或多种另外的治疗活性化合物同时、分开或顺序组合使用,选自CD25、CTLA-4、PD-1、LAG3、TIGIT、ICOS和TNF受体超家族成员、4-1BB、OX-40和GITR。

[1815] B细胞耗竭

[1816] 根据第22方面的第三实施方式的一些实施方式N,其可以并且被建议与根据第22方面的第一和/或第二实施方式的实施方式组合,该用途是与肿瘤内B细胞耗竭同时、分开、或顺序组合使用。肿瘤内B细胞耗竭可通过施用抗体或其他分子或特异性靶向肿瘤内B细胞(优选地CD19+ B细胞)的任何另外的治疗而发生。实施例12.3.2显示了一种治疗,其中施用了抗CCR8抗体并耗竭了肿瘤内CD19+ B细胞。虽然CD8+ T细胞耗竭消除了抗CCR8抗体治疗的有益效果,但令人惊讶地发现,B细胞耗竭改善了抗CCR8抗体治疗的有益效果。不受限制地,可通过使用靶向CD19或CD20的抗体或另一种合适的B细胞标志物来耗竭B细胞。

[1817] 分层/预测和监测方案

[1818] 根据以下实施方式描述的分层步骤也作为独立方法提供,例如用于抗CCR8抗体治疗的分层、诊断或治疗成功监测。

[1819] 根据第22方面的一些第四实施方式,其可以并且被建议与根据第22方面的第一、第二和/或第三实施方式的实施方式组合,该用途包括确定某些参数以预测或监测治疗成功,例如用于对一组受试者或患者进行分层以预测肿瘤响应或监测治疗成功。例如,受试者可以是人类或非人类,例如小鼠、啮齿动物或食蟹猴。

[1820] 根据第22方面的第四实施方式的一些实施方式A,该用途包括确定

[1821] a.肿瘤浸润淋巴细胞的存在或数量,

[1822] b.巨噬细胞和/或NK细胞的存在或数量,

[1823] c.CCR8阳性或FOXP3阳性调节性T细胞的存在或数量,

[1824] d.肿瘤突变负荷,

[1825] e.癌症分期,

[1826] f.干扰素刺激基因或蛋白的存在、水平或激活,

[1827] g.CCR8表达,

[1828] h.补体因子蛋白、丝氨酸蛋白酶抑制剂和/或MHC成分的存在或数量，

[1829] i.细胞因子的存在或数量，例如炎性或抑制性细胞因子，

[1830] j.激活免疫基因表达，

[1831] k.免疫检查点蛋白表达，如PD-(L)1或CTLA4表达，

[1832] l.肿瘤浸润CD19+ B细胞的存在或数量，和/或

[1833] m.肿瘤浸润性CD8+ T细胞的存在或数量，

[1834] 用于对一组受试者或患者进行分层以预测肿瘤反应，或用于预测或监测治疗成功。

[1835] 根据第22方面的第四实施方式的一些实施方式A1，该用途包括测定(a)肿瘤浸润淋巴细胞、(b)巨噬细胞和/或NK细胞、和/或(c)CCR8阳性或FOXP3阳性调节性T细胞的存在或数量。评估细胞类型的存在或数量，例如(a)肿瘤浸润淋巴细胞，(b)巨噬细胞和/或NK细胞，和/或(c)CCR8阳性调节性T细胞可以通过活检进行，例如皮肤活检、手术活检、内窥镜活检或穿刺活检，例如细针穿刺活检、空芯针活检、真空辅助活检或图像引导活检和随后的染色。然后可以将(a)肿瘤浸润淋巴细胞、(b)巨噬细胞和/或NK细胞和/或(c)CCR8阳性调节性T细胞的数量或相对量与参考进行比较，例如参考样本或参考值。(a)肿瘤浸润淋巴细胞、(b)巨噬细胞和/或NK细胞和/或(c)CCR8阳性调节性T细胞的相对存在或数量可用于预测对本发明的抗体或片段治疗的有利反应。或者，可以使用评分系统，例如确定肿瘤浸润淋巴细胞的数量或相对量，如Zhang,Dachuan,et al."Scoring system for tumor-infiltrating lymphocytes and its prognostic value for gastric cancer."Frontiers in immunology 10(2019):71中描述的评分系统。

[1836] 根据第22方面的第四实施方式的一些实施方式A2，该用途包括确定肿瘤突变负荷以预测和监测肿瘤响应。肿瘤突变负荷(TMB)是一种生物标志物，用于测量癌症患者肿瘤中存在的体细胞突变数量，并量化为每兆碱基突变(mut/Mb)。该指标可用于对患者进行分层，例如以预测或监测对根据本发明的抗体或缀合物治疗的响应。存在并可使用FDA批准的测试，例如参考值≥10mut/Mb。或者，微卫星不稳定性(MSI)可用于分层，这是由DNA错配修复系统故障引起的。

[1837] 根据第22方面的第四实施方式的一些实施方式A3，该用途包括确定癌症分期以预测和监测肿瘤响应。可以如本领域已知的那样进行癌症分期，例如使用TNM分类系统或FIGO分期，并可用于对患者进行分层，例如以预测或监测对本发明的抗体或缀合物治疗的响应。

[1838] 根据根据第22方面的第四实施方式的一些实施方式A4，该用途包括确定干扰素或干扰素刺激的基因或蛋白质的存在、水平或激活以用于预测和监测肿瘤响应。干扰素刺激基因是其表达受干扰素，特别是IFNg刺激的基因。合适的干扰素刺激基因或蛋白质包括但不限于ACOD1,ACTG1,ACTR2,ACTR3,ADAMTS13,AIF1,AQP4,ASS1,B2M,BST2,C9JQL5,CALCOCO2,CAMK2A,CAMK2B,CAMK2D,CAMK2G,CASP1,CCL1,CCL11,CCL13,CCL14,CCL15,CCL15,CCL14,CCL16,CCL17,CCL18,CCL19,CCL2,CCL20,CCL21,CCL22,CCL23,CCL24,CCL25,CCL26,CCL3,CCL3L1,CCL4,CCL4L1,CCL5,CCL7,CCL8,CD40,CD44,CD58,CDC42EP2,CDC42EP4,CIITA,CITED1,CLDN1,CX3CL1,CXCL16,CYP27B1DAPK1,DAPK3,EDN1,EPRS,EVL,FCGR1A,FCGR1B,FLNB,GAPDH,GBP1,GBP2,GBP4,GBP5,GBP6,GCH1,GSN,HCK,HLA-A,HLA-B,HLA-C,HLA-DPA1,HLA-DPB1,HLA-DQA1,HLA-DQA2,HLA-DQB1,HLA-DQB2,HLA-DRA HLA-DRB1,

HLA-DRB3,HLA-DRB4,HLA-DRB5,HLA-E,HLA-F,HLA-G,HLA-H,ICAM1,IFI30,IFITM1,IFITM2,IFITM3,IFNG,IFNGR1,IFNGR2,IL12B,IL12RB1 IL23R,IRF1,IRF2,IRF3,IRF4,IRF5,IRF6,IRF7,IRF8,IRF9,JAK1,JAK2,KIF16B,KIF5B,KYNU,LGALS9,MEFV,MID1,MRC1,MT2A,MYO1C,NCAM1,NMI,NOS2,NUB1,OAS1,OAS2,OAS3,OASL,PDE12,PML,PRKCD,PTAFR,RAB12,RAB20,RAB43,RAB7B,RPL13A,RPS6KB1 RYDEN,SEC61A1 SLC11A1 SLC26A6 SLC30A8 SNCA,SP100,STAR,STAT1,STX4,STX8,STXBP1,STXBP2,STXBP3,STXBP4,SYNCRIP TDGF1,TLR2,TLR3,TLR4,TRIM21,TRIM22,TRIM25,TRIM26,TRIM31,TRIM34,TRIM38,TRIM5,TRIM62,TRIM68,TRIM8,UBD,VAMP3,VCAM1,VIM,VPS26B,WAS,WNT5A,XCL1,XCL2,ZYX。

[1839] 根据第22方面的第四实施方式的一些实施方式A5,该用途包括确定CCR8表达用于预测和监测肿瘤响应。可以确定CCR8表达水平,例如基于活检样本,如本领域已知的,例如使用基于IHC、PCR或ELISA的方法,例如使用本文公开的抗体、片段或缀合物。

[1840] 根据第22方面的第四实施方式的一些实施方式A6,该用途包括测定选自(a)补体因子蛋白、(b)丝氨酸蛋白酶抑制剂、(c)MHC组分或(d)Arg2或(e)本文公开的另一种生物标志物的基因或蛋白的存在、水平或激活(参见例如实施例12.7.1或12.7.2)用于预测和监测肿瘤响应。合适的补体因子蛋白包括但不限于C1R、C1S、C4A、C5ar2、F12和MASP2,或它们用于治疗的来自各个物种的类似物。合适的丝氨酸蛋白酶抑制蛋白包括但不限于Serpina1a、Serpina1b、Serpina1d、Serpina3i或它们来自其他物种的类似物。合适的MHC组分包括但不限于H2-K2、H2-T24、H2-Q10、H2-B1、H2-Q1、H2-Q5和H2-DMb2,或它们来自其他物种的类似物。

[1841] 如实施例12.1.2中所讨论的,发明人基于来自同基因小鼠模型的早期肿瘤的全基因组RNA-seq数据发现,以下基因水平的增加与肿瘤响应密切相关:Eif3j2,Eno1b,Ifi441,Hist1h2a1,Ifi202b,Hmga1b,Amd2,Sycp1,Itln1,Trim34b,Catsperg2,Zfp868,Serpina1b,Prss41,Clrb,Cyld,Ccnb1ip1,Masp2,Acaa1b,C4a,Snord93,Abhd1,Serpina3h,H2-K2,Cd1d2,Hal,Rnf151,Rbm46,Arg2,Mir8099-2,Igsf21,Olfr373,C1s2,Crym,Arv1,Hddc3,Plppr4,Ppp1r11,Rps3a2,Zfp459,Rnd1,Serpina1a,Vcpkmt,Atp10d,Gbp2b,H2-T24,T1cd2,Ctse,H2-Q10,Cyp2c55,Borcs8,Tpsab1,Trim43b,Cc2d1a,Serpina1d,Cacna1a,Kcnj14,Ttc13,Farsa,Olfr1217,Jaml,H2-B1,Tnpo2,Rims3,Dock9,Car5b,Atp1a4,H2-Q1,Zfp69,Slpi,Pcdhgb8,Ocel1,Selenbp2,Nsd3,Wt1,Nap112,Ranbp9,Gtpbp3,AY761185,Rnaset2a,Serpina3i,Ell2,Gal3st2b,Urb2,F12,Klk1,Ifi214,Cstl1,Agtpbp1,Msh5,Cox18,Zfp330,Ttc37,Klk4,H2-Q5,Cxcl11,Rab39,Pm20d1,Nod2,H2-DMb2。有趣的是,该集合高度富集了早期补体因子、补体调节因子(如丝氨酸蛋白酶抑制剂)和MHC组分。特别是,高水平补体C1/C4的存在可能有助于Treg裂解。当补体因子的耗竭/消耗降低Treg耗竭的功效时,补充补体系统,例如在联合治疗中可能是一种选择。

[1842] 根据第22方面的第四实施方式的一些优选的实施方式,该用途包括测定选自Eif3j2,Eno1b,Ifi44l,Hist1h2al,Ifi202b,Hmga1b,Amd2,Sycp1,Itln1,Trim34b,Catsperg2,Zfp868,Serpina1b,Prss41,Clrb,Cyld,Ccnb1ip1,Masp2,Acaa1b,C4a,Snord93,Abhd1,Serpina3h,H2-K2,Cd1d2,Hal,Rnf151,Rbm46,Arg2,Mir8099-2,Igsf21,Olfr373,C1s2,Crym,Arv1,Hddc3,Plppr4,Ppp1r11,Rps3a2,Zfp459,Rnd1,Serpina1a,Vcpkmt,Atp10d,Gbp2b,H2-T24,T1cd2,Ctse,H2-Q10,Cyp2c55,Borcs8,Tpsab1,Trim43b,

Cc2d1a,Serpina1d,Cacna1a,Kcnj14,Ttc13,Farsa,Olfr1217,Jaml,H2-B1,Tnpo2,Rims3,Dock9,Car5b,Atp1a4,H2-Q1,Zfp69,Slpi,Pcdhgb8,Ocel1,Selenbp2,Nsd3,Wt1,Nap1l2,Ranbp9,Gtpbp3,AY761185,Rnaset2a,Serpina3i,Ell2,Gal3st2b,Urb2,F12,Klk1,Ifi214,Cstl1,Agtpbp1,Msh5,Cox18,Zfp330,Ttc37,Klk4,H2-Q5,Cxcl11,Rab39,Pm20d1,Nod2,H2-DMb2或其任何组合的基因或蛋白质的存在、水平或激活用于预测和监测肿瘤响应。如本领域技术人员立即理解的,对于人类受试者,分层、预测或监测方法包括确定所提供基因或蛋白的人类对应物的存在、水平或激活。

[1843] 根据第22方面的第四实施方式的一些实施方式A7,该用途包括确定炎性或抑制性细胞因子的存在或数量以预测和监测肿瘤响应。炎性或抑制性细胞因子的存在或数量的评估可以如本领域已知的那样进行。

[1844] 根据第22方面的第四实施方式的一些实施方式A8,该用途包括基于免疫基因表达的激活来预测或监测肿瘤响应。可以使用本领域已知的方法测量免疫基因表达的激活,例如使用基因集富集分析或使用本领域已知的基于标志物的测定。此外,分层、预测或监测可基于激活的Treg或免疫细胞的基因签名特征发生。

[1845] 根据第22方面的第四实施方式的一些高度优选的实施方式A9,该用途包括对一组受试者或患者进行分层以基于免疫检查点蛋白表达预测肿瘤响应,例如PD-L1表达、PD-1表达或CTLA4表达,或用途包括确定免疫检查点蛋白表达水平,例如PD-L1表达、PD-1表达或CTLA4表达,以预测和监测肿瘤响应。

[1846] 程序性死亡配体1(PD-L1)是一种免疫相关生物标志物,其可以在包括肿瘤细胞在内的许多组织类型的表面上表达。PD-L1蛋白表达可以通过使用肿瘤比例评分(TPS)或联合阳性评分(CPS)来确定。根据本发明,出人意料地发现,对于具有ICI响应性肿瘤特别是具有(高)PD-L1表达的肿瘤的受试者,对使用抗CCR8抗体的(单一)疗法的响应得到改善(参见实施例12.7)。根据这一观察结果,发明人发现FoxP3+ Treg细胞浸润同样与高PD-L1表达相关。因此,发明人建议将PD-L1作为分层的替代标志物,以克服CCR8难以分析并因此不能轻易用于选择最有可能受益于抗CCR8抗体治疗的受试者群体的问题。在特别优选的实施方式中,PD-L1表达是基于CPS或TPS确定的。如果PD-L1表达存在或高,例如如CPS≥1,优选地CPS≥5,最优选地CPS≥10所示,或如TPS≥1%,优选地TPS≥10%,最优选地TPS≥50%所示,受试者或患者被确定为适合用抗CCR8抗体治疗。

[1847] 方面23-进一步和诊断用途

[1848] 本文所述的抗趋化因子受体或抗CCR8抗体、片段和缀合物可用于多种目的,例如帮助纯化或固定趋化因子受体或CCR8表达细胞,例如激活的或肿瘤内的Tregs,用于体外、体内和离体应用或诊断。作为具体实例,抗体可用于定性和/或定量测量生物样品中趋化因子受体或趋化因子受体表达细胞水平的免疫测定,参见,例如Harlow et al.,Antibodies:A Laboratory Manual,Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988)。

[1849] 例如,抗趋化因子受体抗体、抗CCR8抗体或其抗原结合片段可用于检测表达趋化因子受体或CCR8的肿瘤的存在。可以分析各种生物样本(包括血清和组织活检样本)中趋化因子受体或CCR8表达细胞或脱落趋化因子受体或CCR8的存在或水平。此外,抗趋化因子受体或抗CCR8抗体可用于各种成像方法,例如使用99Tc(或不同同位素)缀合抗体的免疫闪烁显像术。例如,与描述的使用111In缀合抗PSMA抗体的成像方案类似的成像方案可用于检测

癌症(Sodee,D.Bruce,et al."Preliminary Imaging Results Using In-111 Labeled CYT-356(Prostascintst)in the Detection of Recurrent Prostate Cancer."Clinical nuclear medicine 21.10(1996):759-767.)。可以使用的另一种检测方法是正电子发射断层扫描,例如通过将本发明的抗体与合适的同位素缀合(参见Herzog,Hans,et al."Measurement of pharmacokinetics of yttrium-86 radiopharmaceuticals with PET and radiation dose calculation of analogous yttrium-90 radiotherapeutics."Journal of Nuclear Medicine 34.12(1993):2222-2226)。

[1850] 根据第23方面,提供了根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段,或根据第19方面地缀合物或根据第20方面的药物组合物用于诊断应用或诊断。

[1851] 在第23方面的一些第一实施方式中,提供了根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段,或根据第19方面地缀合物或根据第20方面的药物组合物用于体内诊断方法。该用途可以是用于诊断以趋化因子受体阳性细胞为特征的肿瘤或疾病的用途,例如CCR8阳性细胞,如CCR8阳性调节性T细胞。例如,以趋化因子受体阳性细胞为特征的肿瘤或疾病选自T细胞急性淋巴细胞白血病、乳腺癌、三阴性乳腺癌、三阳性乳腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)睾丸癌、胃癌、头颈部鳞状细胞癌、胸腺瘤、食管腺癌、结直肠癌、胰腺癌、卵巢癌或宫颈癌、急性髓系白血病、肾癌、膀胱癌、皮肤癌、黑色素瘤、甲状腺癌、间皮瘤、肉瘤和前列腺癌。根据一些优选的实施方式,在体内诊断方法中的用途是在头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌、食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌和/或前列腺癌、或本文所述的任何其他肿瘤的诊断中的用途。

[1852] 根据一些优选的实施方式,根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段,或根据第19方面地缀合物或根据第20方面的药物组合物用于治疗受试者或患者的分层,例如用于治疗本文所述的疾病。

[1853] 方面24-CCR8抗体的DNA/RNA

[1854] 根据第24方面,提供了编码根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段的多核苷酸。优选地,根据该方面的多核苷酸是根据序列表提供的多核苷酸。

[1855] 方面25-抗体载体

[1856] 根据第25方面,提供了包含根据第24方面的多核苷酸的载体。各种合适的载体系统是本领域已知的或本文描述的。

[1857] 方面26-抗体的生产细胞

[1858] 根据第26方面,提供了一种分离的细胞,其被安排用于产生根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段。优选地,根据当前方面的分离细胞是真核细胞,例如包含根据第25方面的载体的CHO或HEK细胞。在另一个优选的实施方式中,细胞是大鼠骨髓瘤YB2/0细胞。

[1859] 方面27-抗体的生产方法

[1860] 根据第27方面,提供了一种产生根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段或根据第19方面的缀合物的方法,包括培养根据第26方面的细胞和任选地纯化抗体或抗原结合片段。在一些高度优选的实施方式中,该方法包括抗体

的非岩藻糖基化，如本文别处所述在一些实施方式中，该方法包括抗体的纯化。

[1861] 例如，本发明的抗体可以通过下述纯化方法进行纯化。所描述的纯化过程适用于范围广泛的单克隆IgG抗体，并针对高达8g/L的生物反应器滴度进行了优化，预期收获体积为来自一次性或不锈钢生物反应器的2000L。通过适当的修饰，可以处理具有其他滴度范围的抗体培养物。通过深度过滤和/或带电过滤收集和澄清细胞培养物。澄清后的收获物储存在一次性袋中或可选的冷却的不锈钢储罐中。

[1862] 一般工艺条件

[1863] 优选封闭式处理和一次性系统；通过适当的清洁和转换程序，不锈钢滑道或系统也是可能的。一次性袋子通常采用低密度或超低密度聚乙烯作为接触层。除其他外，可以使用乙酸钠/乙酸或Tris/Tris-HCl缓冲系统，通常总浓度为50mM，包括50mM NaCl，除非另有说明。各个单元操作(例如上样、洗脱或流穿)的缓冲液和过程中间体通常经过0.2μm在线过滤或使用过滤组件，例如使用PES膜和/或羊毛过滤器。这些溶液通常在环境温度(例如18-26℃)或2-8℃条件下储存在一次性袋或不锈钢容器中。

[1864] 捕获

[1865] 使用基于蛋白A的色谱法进行抗体捕获，例如利用Cytiva MabSelect SuRe、MabSelect SuRe LX、Mab Select PrismA或Purolite A50树脂。在有或没有通过超滤预浓缩的情况下，在澄清后进行加载。加载密度通常为45-75g/L，使用单一或可变流速将澄清的收获物应用到柱子上(120-400厘米/小时)。层析可以使用一根或多根柱以批处理模式进行，也可以使用最多8根柱以连续(MCC(多柱层析)/SMB(模拟移动床))模式进行。对于批处理模式，预装柱或自装柱的典型床高为20cm。对于连续模式，目标是澄清收获物与树脂的接触时间为1-4分钟。根据抗体滴度，捕获在一个或多个循环中进行。在加载之前，使用Tris缓冲液(例如pH 7)平衡色谱柱；洗涤以至少两个洗涤步骤进行；在醋酸盐缓冲液中第一洗涤缓冲液中的NaCl浓度高，然后第二缓冲液中的NaCl浓度低(例如第一次洗涤：1M NaCl，pH 5.5；第二次洗涤：50mM NaCl，pH 6.0)。例如，洗脱可以通过含有0-50mM NaCl的低pH(例如3.5)醋酸盐缓冲液实现，通常≤5个柱体积(CV)，并使用UV或体积控制洗脱液收集。洗脱液可以在这一步或病毒灭活后汇集并充分混合。亲和柱通过≥3CV乙酸(例如0.1M，包括500mM NaCl)再生，使用0.5-1.0M NaOH进行消毒(就地清洗，CIP)30分钟，使用≥4CV重新平衡。该柱存储在例如20％EtOH或2％BnOH。

[1866] 或者，可以使用与上述相同的加载方案和缓冲系统，在纤维素结构(例如Fibro PrismA)上使用亲和配体从澄清的收获物中进行亲和捕获。可以跳过再生或CIP块以获得最佳处理时间。5-20秒的接触时间可应用于不同尺寸的Fibro装置(例如0.4mL至2.4L)。通常，可以实现25-35g/L单位体积的负载能力。单个单元可用于处理单个批次或多个批次，具体取决于Fibro单元和生物反应器的大小以及抗体培养物的滴度。亲和负载材料可以在负载前以＞300L/m2的吞吐量通过带电过滤器进一步澄清，以最大限度地延长使用寿命并最大限度地减少污染。

[1867] 低pH病毒灭活

[1868] 捕获洗脱液用HOAc或HCl调节至pH值3.7-3.9，并在≥18℃的相同或单独袋中保持120-240分钟，以灭活可能存在的病毒。或者，病毒灭活在pH 3.4-3.6下进行＞30分钟。然后将工艺中间体调整至储存或进一步加工条件，例如使用1-2M Tris/-HCl滴定剂储备液调节

至pH 4-7。

[1869] 精制(polishing)1

[1870] 抗体通过阴离子交换层析(AEX)进一步精制,通常采用膜囊或膜盒(例如Sartorius Sartobind STIC PA 4mm或3M MA ST Polisher)的流通模式,流速≤350MV/h,用于去除工艺相关和/或产品相关的杂质和颗粒。根据抗体的量,可以在一个或多个循环中处理来自一批的全部量。在加载之前,将中间体调整到目标电导率,例如8-20mS/cm,以及目标pH值,例如对于具有基本等电点的抗体为7.0。对于等电点低于pH 7.0的抗体,电导率可以为5-20mS/cm,pH可以在其等电点和pH 5.0之间。膜用Tris缓冲液pH 7.0或乙酸盐缓冲液pH 5-6平衡、装载密度一般在0.5-10g抗体/mL膜体积(MV)之间。可以执行具有平衡缓冲液的洗(chase)并与收集的流出物组合,其收集标准由例如紫外线或体积控制。膜吸附器可以使用一次或多次,为此它被再生(对于25MV,1M NaCl)并重新平衡(Tris缓冲液pH 7.0)。

[1871] 精制2

[1872] 最终精制可以例如通过阳离子交换层析(CEX)来实现。原则上,AEX和CEX单元操作的顺序可以颠倒。CEX单元操作通常在结合和洗脱模式下进行,流速在100-200cm/h之间。带有树脂的预装柱或自装柱,例如Cytiva Capto S ImpAct或Capto SP ImpRes可在20cm床高下使用。根据抗体的量,改进步骤在一个或多个循环中进行。如果需要,可以使用HOAc、Tris滴定剂或WFI将负载调整到5-9mS/cm之间的目标电导率和pH 4.5-7.5。以40-105g/L之间的典型密度将负载施加到用≥5CV醋酸盐缓冲液(pH和电导率与CEX负载匹配)平衡的CEX柱上,然后使用≥5CV的相同缓冲液进行清洗。使用具有合适NaCl浓度(>50mM;<500mM)的醋酸盐缓冲液洗脱抗体,并通过紫外线控制收集洗脱液,收集的洗脱液体积通常≤10CV。使用0.5-2M NaCl的醋酸盐缓冲液对色谱柱进行再生、重新平衡(≥5CV,使用CEX平衡缓冲液)、消毒(0.5-1.0M NaOH,持续≥30分钟)、重新平衡(≥5CV,使用CEX平衡缓冲液),最后存储在例如20%EtOH或2%BnOH。

[1873] 另外的精制

[1874] 当需要另外的精制以去除残留的产品或工艺相关杂质时,可以使用混合模式色谱(MMC)代替或与CEX步骤一起使用。混合模式色谱树脂的实例是Capto adhere和Capto MMC ImpRes。该单元操作通常以流通模式操作,但也可以采用结合-洗脱模式。该色谱柱可以自行填充或预填充,床高为5-20厘米,具有各种直径,并在流穿模式下以100-500厘米/小时的流速运行或以结合-洗脱模式下以100-220厘米/小时的流速运行。

[1875] 如果需要,通常会使用HOAc、Tris滴定剂或WFI将负载调整到3-12mS/cm之间的目标电导率和4.2-7.5的pH值。负载以75-300g/L之间的典型密度施加到用≥5CV醋酸盐缓冲液(pH和电导率与MMC负载匹配)平衡的MMC柱上。可以执行具有平衡缓冲液的洗(chase)并与收集的流出物组合,其收集标准由例如紫外线或体积控制。MMC柱可以使用一次或多次,具体取决于要精制的抗体量。使用醋酸缓冲液中的0.5-2M NaCl再生柱子,重新平衡(≥5CV,使用平衡缓冲液),消毒(0.5-1.0M NaOH≥30分钟),最后储存在例如20%EtOH或2%BnOH。。

[1876] 纳滤

[1877] 可能残留的外来病毒通过基于PDVF的纳滤去除,例如使用带或不带预过滤器的Planova BioEX。在恒定压力(例如2.0-3.4bar)下以1500-5000g抗体/m^2的装载密度将负载

施加到预平衡的纳米过滤器(≥5L/m^2乙酸盐缓冲液,配方例如与MA AEX或CEX洗脱条件相匹配)。可以使用相同的缓冲液追踪过滤器,并且通常在使用后测试过滤器的完整性。在完整性测试失败时,可以重复此步骤。或者,可以通过带或不带预滤器的基于纤维素的纳滤去除外来病毒。在恒定压力(例如0.8-1.2bar)下以500-2000g抗体/m^2的装载密度将负载施加到预平衡的纳米过滤器(≥5L/m^2乙酸盐缓冲液,配方例如与MA AEX或CEX洗脱条件相匹配)。

[1878] 浓缩和缓冲液交换

[1879] 中间体通过超滤浓缩至15-110g/L,用≥6渗滤体积对渗滤缓冲液(DFB)(例如10mM组氨酸、10mM蛋氨酸、30mM精氨酸,pH 5.3)进行渗滤,如果需要,进一步浓缩至200g/L。这通常使用切向流过滤装置和截留值为30-50kDa的合适膜(例如Millipore Pellicon、Sartorius Hydrosart、Pall Omega)进行,载量通常为300-1000g抗体/m^2。该过程通常由进料或滞留流量(例如2-7L/min/m^2)控制,或者由进料压力(2-4bar)和TMP(0.7-2bar)控制。膜可以被DFB洗,并且合并的截留物用DFB稀释至目标浓度。TFF系统和膜用0.5M NaOH消毒,并用醋酸盐缓冲液或DFB平衡。膜完整性或渗透性在使用前进行测试。

[1880] 稳定

[1881] 在可选的稳定化步骤中,添加赋形剂浓缩物以生产原料药(BDS)。生物负载减少过滤(例如0.2μm)是使用例如预平衡过滤器(例如在DFB中稀释的赋形剂浓缩物),在使用后进行完整性测试。在完整性测试失败时,可以重复过滤步骤。

[1882] 填充和冻结

[1883] BDS装在带有LDPE接触层(例如5或10L)的合适袋子中,其带有优选的无菌连接和断开的i.d.采样室。这些袋子通过任选的真空密封(LDPE外包装袋)进行单独保护包装,并放置在保护壳(例如RoSS壳)中。在任选的2-8℃中间储存后,壳袋被冷冻(使用平板或被动冷冻机),随后储存在≤-30或≤-60℃,例如+/-5℃,或者≤-25或≤-60℃,例如+/-5℃。

[1884] 方面28-具有由抗原定义的抗体的试剂盒或部分

[1885] 根据第28方面,提供了一种试剂盒,其包含根据第6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17和/或18方面的抗体或抗原结合片段、或根据第19方面的缀合物或根据第20方面的药物组合物,以及使用说明书。

[1886] 本发明的抗体、片段、缀合物或药物组合物可以在试剂盒中提供,即在一个或多个容器中以预定量包装的试剂组合以及说明书。例如,当抗体、片段或缀合物是治疗性抗体、片段或缀合物时,使用说明可包括包装插页。例如,包装插页可包括描述如本文所述的有利施用模式或组合治疗的信息。

[1887] 例如,当抗体用酶标记时,试剂盒可包括酶所需的底物和辅助因子(例如,提供可检测发色团或荧光团的底物前体)。此外,可以包括其他添加剂,例如稳定剂、缓冲液(例如封闭缓冲液或裂解缓冲液)等。各种试剂的相对量可以广泛变化以提供基本上优化测定的灵敏度的试剂的溶液浓度。特别地,试剂可以作为干粉提供,通常是冻干的,包括在溶解时将提供具有适当浓度的试剂溶液的赋形剂。

[1888] 方面29-包含抗CCR8抗体的组合疗法

[1889] 根据一个方面,提供了用于治疗肿瘤的抗CCR8抗体和另外的治疗活性化合物或疗法,其中所述另外的治疗活性化合物是

[1890] a)化疗剂,优选地紫杉烷、多柔比星、顺铂、卡铂、奥沙利铂或吉西他滨,

[1891] b)靶向其他趋化因子受体的抗体,例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1或CXCR1,

[1892] c)靶向肿瘤细胞特异性表达的蛋白的抗体,

[1893] d)靶向HER2和/或EGFR的抗体或小分子,

[1894] e)任何头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌、食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌和/或前列腺癌的标准治疗,

[1895] f)靶向激酶抑制剂,例如索拉非尼、瑞戈非尼或MEKi-1,和/或

[1896] g)放射治疗。

[1897] 换而言之,提供了一种抗CCR8抗体,优选地如本文别处所述的诱导ADCC和/或ADCP的抗CCR8抗体,用于治疗肿瘤,其中该用途包括施用不靶向检查点蛋白并选自以下的另外的治疗活性化合物或疗法

[1898] h)化疗剂,优选紫杉烷、紫杉醇、多柔比星、顺铂、卡铂、奥沙利铂或吉西他滨,

[1899] i)靶向另外的趋化因子受体的抗体,例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1或CXCR1,

[1900] j)靶向肿瘤细胞特异性表达的蛋白的抗体,

[1901] k)靶向HER2和/或EGFR的抗体或小分子,

[1902] l)任何头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌、食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌和/或前列腺癌的标准治疗,

[1903] m)靶向激酶抑制剂,如索拉非尼、瑞戈非尼或MEKi-1,

[1904] n)放射治疗,和/或

[1905] o)(化合物或抗体用于)肿瘤内B细胞,优选地CD19+ B细胞的耗竭。

[1906] 抗CCR8抗体可以是如本文所述的本发明的抗CCR8抗体或本领域已知的任何其他治疗上合适的抗CCR8抗体。肿瘤可以是本文所述的任何肿瘤,例如针对第22方面。优选地,肿瘤或疾病的特征在于趋化因子受体阳性细胞,例如CCR8阳性细胞,例如CCR8阳性调节性T细胞或CCR8阳性肿瘤细胞。优选地,肿瘤是ICI响应性肿瘤。基于本文描述的实例(例如实施例12.6 ff.,参见响应小鼠模型),似乎有道理的是,特别是那些对免疫检查点抑制有响应或最初对免疫检查点抑制有响应的肿瘤将受益于抗CCR8抗体治疗,无论是单独治疗还是组合。另外的治疗活性化合物可以是如本文别处所述的治疗活性化合物。可以选择合适的紫杉烷,例如来自紫杉醇、白蛋白结合型紫杉醇、卡巴他赛或多烯紫杉醇或其衍生物。根据一个优选的实施方式,该用途还包括施用检查点抑制剂,例如抗-PD-1抗体、抗-PD-L1抗体或CTLA4抗体,例如如本文别处所述。

[1907] 方面30-包含抗CCR8抗体的三重组合治疗

[1908] 根据一个方面,提供了抗CCR8抗体、检查点抑制剂如抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体或CTLA4抗体,和另外的治疗活性化合物或疗法用于治疗肿瘤,其中另外的治疗活性化合物或疗法优选地为

[1909] a)靶向其他趋化因子受体的抗体,例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1或CXCR1,

[1910] b)靶向肿瘤细胞特异性表达的蛋白的抗体,

[1911] c)靶向HER2和/或EGFR的抗体或小分子，

[1912] d)任何头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌、食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌和/或前列腺癌的标准治疗，

[1913] e)化疗剂，优选紫杉烷、紫杉醇、多柔比星、顺铂、卡铂、奥沙利铂或吉西他滨，

[1914] f)靶向激酶抑制剂，例如索拉非尼、瑞戈非尼或MEKi-1，和/或

[1915] g)放射治疗，

[1916] h)(化合物或抗体用于)肿瘤内B细胞，优选地CD19+ B细胞的耗竭。

[1917] 换言之，提供了用于治疗肿瘤的诱导ADCC和/或ADCP的抗CCR8抗体，其中该用途包括施用不靶向检查点蛋白并且选自如下的另外的治疗活性化合物或疗法

[1918] a)化疗剂，优选紫杉烷、紫杉醇、多柔比星、顺铂、卡铂、奥沙利铂或吉西他滨，

[1919] b)靶向其他趋化因子受体的抗体，例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1或CXCR1，

[1920] c)靶向肿瘤细胞特异性表达的蛋白的抗体，

[1921] d)靶向HER2和/或EGFR的抗体或小分子，

[1922] e)靶向激酶抑制剂，如索拉非尼、瑞戈非尼或MEKi-1，

[1923] f)放射治疗，和/或

[1924] 耗竭肿瘤内B细胞，优选地CD19+ B细胞，并且该用途还包括施用检查点抑制剂，例如抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体或CTLA4抗体，例如如本文别处所述。

[1925] 方面31-包含抗CCR8抗体的顺序组合治疗

[1926] 根据一个方面，提供了用于治疗肿瘤的抗CCR8抗体和另外的治疗活性化合物或疗法，其中在第一剂抗CCR8抗体之后施用一剂另外的治疗活性化合物或疗法，例如

[1927] a)在抗CCR8抗体使瘤内CD8细胞与T reg细胞的比率至少增加2、3、4或5倍后，或

[1928] b)在抗CCR8抗体耗竭至少40％、45％、50％、55％、60％、65％或70％的瘤内Treg细胞后。

[1929] 换而言之，提供了一种抗CCR8抗体，优选地如本文别处所述的诱导ADCC和/或ADCP的抗CCR8抗体，用于治疗肿瘤，其中该用途包括施用另外的治疗活性化合物或疗法，其中在第一剂抗CCR8抗体之后施用一剂另外的治疗活性化合物或疗法，优选地

[1930] a)在抗CCR8抗体诱导肿瘤内CD8细胞与T reg细胞比率至少增加2、3、4或5倍后，或

[1931] b)在抗CCR8抗体耗竭至少40％、45％、50％、55％、60％、65％或70％的肿瘤内Treg细胞后。

[1932] 根据优选的治疗方案，治疗开始于施用第一剂抗CCR8抗体(例如如上所述每天一次、每周一次、q2w、q3w或q4w)，随后施用另外的治疗活性化合物或疗法。不受理论的束缚，应该选择抗CCR8抗体的初始剂量和另外的治疗活性化合物之间的时间以允许至少40、50或60％的肿瘤内Treg耗竭。抗CCR8抗体可以是如本文所述的本发明的抗CCR8抗体，但也可以是任何其他治疗上合适的抗CCR8抗体。肿瘤可以是本文所述的任何肿瘤，例如对于第22方面。优选地，肿瘤或疾病的特征在于趋化因子受体阳性细胞，例如CCR8阳性细胞，例如CCR8阳性调节性T细胞或CCR8阳性肿瘤细胞。优选地，该肿瘤是或最初是ICI响应性肿瘤。由于对PD(L)-1抗体的获得性耐药可能会受到肿瘤内激活的调节性T细胞(以CCR8表达为特征)的强烈影响，因此使用抗CCR8抗体与检查点抑制剂相结合的顺序治疗有利于克服这种获得性

耐药。发现在第一剂抗CCR8抗体后施用另外的治疗活性化合物或疗法可显著提高治疗效果,即使对于极具挑战性的肿瘤模型也是如此。第一剂抗CCR8抗体与另外治疗活性化合物的剂量之间的时间应足以诱导第一抗肿瘤免疫反应。根据本文提供的数据(参见实施例12.6 ff),这表现为肿瘤内CD8细胞与T reg细胞的比率至少增加2、3、4或5倍或(暂时)耗竭至少40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%的肿瘤内Treg细胞。

[1933] 另外的治疗活性化合物或疗法可以是本文别处公开的任何化合物或疗法。治疗活性化合物可以是也可以不是检查点抑制剂,例如抗PD-L1抗体、抗PD1抗体或抗CTLA4抗体。尽管第二治疗剂可以是非靶向治疗剂,但已发现靶向治疗剂对于该目的是高度优选的。如本文所定义的靶向治疗剂是特异性识别肿瘤细胞而不是所有快速分裂细胞或免疫细胞群的治疗活性化合物。尽管靶向所有分裂细胞或影响免疫细胞群的药物可以组合使用并可以提高疗效(参见实施例12.6.8、12.6.9),但它们可能会干扰可持续免疫肿瘤响应所需的免疫细胞群。通过使用靶向肿瘤细胞特异性表达的蛋白的抗体解决了这个问题。优选的靶向治疗是结合由肿瘤细胞特异性表达的蛋白的抗体。

[1934] 优选地,另外的治疗活性化合物或疗法选自

[1935] a)针对检查点蛋白的抗体或小分子,例如PD-(L)1或CTLA-4,

[1936] b)化疗剂,优选紫杉烷、紫杉醇、多柔比星、顺铂、卡铂、奥沙利铂或吉西他滨,

[1937] c)靶向其他趋化因子受体的抗体,例如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1或CXCR1,

[1938] d)靶向肿瘤细胞特异性表达的蛋白的抗体,

[1939] e)靶向HER2和/或EGFR的抗体或小分子,

[1940] f)靶向激酶抑制剂,如索拉非尼、瑞戈非尼或MEKi-1,

[1941] g)任何头颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、鳞状细胞癌、食道肿瘤、黑色素瘤、膀胱癌、肝癌和/或前列腺癌的标准治疗,

[1942] h)放射治疗,和/或

[1943] i)(用于)肿瘤内B细胞,优选地CD19+ B细胞耗竭的化合物或抗体。

[1944] 可以选择合适的紫杉烷,例如来自紫杉醇、白蛋白结合型紫杉醇、卡巴他赛或多烯紫杉醇或其衍生物。

[1945] 优选地,另外的治疗活性化合物或疗法的剂量是所述另外的治疗活性化合物或疗法的第一剂量。

[1946] 方面32-分层方法/诊断方法

[1947] 如本文别处所讨论的,针对根据第22方面的第四实施方式描述的分层步骤可以用作根据第22方面的治疗方法的一部分,或者单独提供作为

[1948] a)选择最有可能受益于抗CCR8抗体治疗的受试者的方法,

[1949] b)诊断肿瘤对抗CCR8抗体治疗敏感的诊断方法,或

[1950] c)一种监测抗CCR8抗体治疗成功的方法。

[1951] 对于当前方面,抗体可以是根据本发明的抗体,但也可以是任何治疗上合适的抗CCR8抗体。

[1952] 用于抗CCR8抗体治疗的生物标志物

[1953] 到目前为止,没有生物标志物可用于预测或监测抗CCR8抗体的治疗成功率。虽然

所证明的作用模式表明CCR8本身可以作为一种可能的生物标志物,但发明人发现CCR8水平在临床设置或临床研究中有些难以评估。为了解决这个紧迫的问题,发明人提出了假设并且可以验证其中一些作为具有出色预测能力的合适生物标志物,参见例如实施例12.7.1和12.7.2。标志物表达水平通常用本领域已知的测定或方法确定,随后将该水平与本文别处所述的参考值进行比较,并随后用于预测或监测治疗反应。

[1954] 提供了用于将受试者诊断/分级为具有抗CCR8抗体治疗敏感的肿瘤的方法的生物标志物,该用途包括

[1955] a.确定肿瘤或包含调节性T细胞的肿瘤样品中生物标志物的水平,

[1956] b.将生物标志物的水平与参考样本或值进行比较,以及

[1957] c.如果生物标志物的水平高于或等于参考样品或值,则将受试者诊断/分级为具有抗CCR8抗体治疗敏感的肿瘤,

[1958] 其中生物标志物是

[1959] d.免疫检查点蛋白,优选地PD-1、PD-L1或CTLA4,

[1960] e.粒酶或免疫细胞标志物,优选地淋巴细胞、效应细胞、T细胞、细胞毒性T细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、B细胞、NK细胞或其组合的标志物,

[1961] f.Treg浸润标志物,优选地CCR8,FOXP3,ICOS,CCR4,TIGIT,P2RY10,CD80,TNFRSF9,CD3(G),SLAMF1,IL7R,IL2RB,CTLA4,CD5,ITK,IL2RA,LAX1,IKZF3,GBP5,CXCR6,SIRPG,CD2,CSF2RB,SLAMF7或CXCL9,

[1962] g.T细胞标志物或细胞毒性T细胞标志物优选地选自CD3、CD4、CD8、CD25、CXCR3、CCR5、4-1BB、OX-40或GITR,

[1963] h.干扰素或干扰素诱导蛋白,优选地选自IFNγ、IL10、IL12p70、IL1β、IL2和TNFα,

[1964] i.补体因子,

[1965] j.丝氨酸蛋白酶抑制剂,和/或

[1966] k.源自表12.7.2.1、12.7.2.2或12.7.2.3的基因的分子。

[1967] 优选地,生物标志物是免疫检查点蛋白,最优选地PD-1、PD-L1或CTLA4。

[1968] 还提供了生物标志物用于预测或监测包括施用抗CCR8抗体的疗法的治疗成功的用途,该用途包括

[1969] a.确定样本中生物标志物的水平,以及

[1970] b.将生物标志物的水平与参考样本或值进行比较,

[1971] 其中生物标志物是

[1972] c.免疫检查点蛋白,优选地PD-1、PD-L1或CTLA4,

[1973] d.颗粒酶或免疫细胞标志物,优选地淋巴细胞、效应细胞、T细胞、细胞毒性T细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、B细胞、NK细胞或其组合

[1974] e.Treg浸润标志物,优选地选自FOXP3,ICOS,CCR4,TIGIT,P2RY10,CD80,TNFRSF9,CD3(G),SLAMF1,IL7R,IL2RB,CTLA4,CD5,ITK,IL2RA,LAX1,IKZF3,GBP5,CXCR6,SIRPG,CD2,CSF2RB,SLAMF7,CXCL9,

[1975] f.T细胞标志物或细胞毒性T细胞标志物,优选地选自CD3、CD4、CD8、CD25、CXCR3、CCR5和TNF受体超家族成员,例如4-1BB、OX-40或GITR,

[1976] g.干扰素诱导蛋白,优选地选自IFNγ、IL10、IL12p70、IL1β、IL2和TNFα,

[1977] h.补体因子，

[1978] i.丝氨酸蛋白酶抑制剂和/或

[1979] j.源自表12.7.2.1、12.7.2.2或12.7.2.3的基因的分子。

[1980] 优选地，生物标志物是免疫检查点蛋白，最优选地PD-1、PD-L1或CTLA4。

[1981] 此外，还提供了结合生物标志物的分子，其用于将受试者诊断/分级为具有抗CCR8抗体治疗敏感的肿瘤的方法，该用途包括使用结合生物标志物的分子测定肿瘤或肿瘤样品中生物标志物的水平，其中生物标志物是(优选地)

[1982] a.免疫检查点蛋白，优选地PD-1、PD-L1或CTLA4，

[1983] b.颗粒酶或免疫细胞标志物，优选地淋巴细胞、效应细胞、T细胞、细胞毒性T细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、B细胞、NK细胞或其组合的标志物

[1984] c.Treg浸润标志物，优选地CCR8，FOXP3，ICOS，CCR4，TIGIT，P2RY10，CD80，TNFRSF9，CD3(G)，SLAMF1，IL7R，IL2RB，CTLA4，CD5，ITK，IL2RA，LAX1，IKZF3，GBP5，CXCR6，SIRPG，CD2，CSF2RB，SLAMF7或CXCL9，

[1985] d.T细胞标志物或细胞毒性T细胞标志物优选地选自CD3、CD4、CD8、CD25、CXCR3、CCR5、4-1BB、OX-40或GITR，

[1986] e.干扰素或干扰素诱导蛋白，优选地选自IFNγ、IL10、IL12p70、IL1β、IL2和TNFα，

[1987] f.补体因子，

[1988] g.丝氨酸蛋白酶抑制剂，和/或

[1989] h.源自表12.7.2.1、12.7.2.2或12.7.2.3的基因的分子。

[1990] 结合生物标志物的分子优选地是抗体或抗原结合片段，或其缀合物。最优选地，结合生物标志物的分子是抗PD-1、PD-L1或CTLA4抗体，例如Nivolumab、Pembrolizumab、Atezolizumab、Avelumab、Durvalumab、Cemiplimab、Dostarlimab或Ipilimumab。

[1991] 此外，还提供结合生物标志物的分子用于预测或监测包括施用抗CCR8抗体的疗法的治疗成功的用途，该用途包括使用结合生物标志物的分子确定肿瘤或肿瘤样品中生物标志物的水平，其中生物标志物是(优选地)

[1992] a.免疫检查点蛋白，优选地PD-1、PD-L1或CTLA4，

[1993] b.粒酶或免疫细胞标志物，优选地淋巴细胞、效应细胞、T细胞、细胞毒性T细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、B细胞、NK细胞或其组合的标志物，

[1994] c.Treg浸润标志物，优选地CCR8，FOXP3，ICOS，CCR4，TIGIT，P2RY10，CD80，TNFRSF9，CD3(G)，SLAMF1，IL7R，IL2RB，CTLA4，CD5，ITK，IL2RA，LAX1，IKZF3，GBP5，CXCR6，SIRPG，CD2，CSF2RB，SLAMF7或CXCL9，

[1995] d.T细胞标志物或细胞毒性T细胞标志物优选选自CD3、CD4、CD8、CD25、CXCR3、CCR5、4-1BB、OX-40或GITR，

[1996] e.干扰素或干扰素诱导蛋白，优选地选自IFNγ、IL10、IL12p70、IL1β、IL2和TNFα，

[1997] f.补体因子，

[1998] g.丝氨酸蛋白酶抑制剂，和/或

[1999] h.源自表12.7.2.1、12.7.2.2或12.7.2.3的基因的分子，和

[2000] 其中结合生物标志物的分子优选地是抗体或抗原结合片段，或其缀合物。最优选地，结合生物标志物的分子是抗检查点、抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA4抗体，例如Nivolumab、

Pembrolizumab、Atezolizumab、Avelumab、Durvalumab、Cemiplimab、Dostarlimab或Ipilimumab。

[2001] 在当前方面的优选的实施方式中，生物标志物是免疫细胞标志物，结合生物标志物的分子优选地是结合淋巴细胞、效应细胞、T细胞、细胞毒性T细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、B细胞、NK细胞的标志物或其组合的抗体。

[2002] 在当前方面的优选的实施方式中，结合生物标志物的分子是结合Treg浸润标志物的分子，优选地结合CCR8，FOXP3，ICOS，CCR4，TIGIT，P2RY10，CD80，TNFRSF9，CD3(G)，SLAMF1，IL7R，IL2RB，CTLA4，CD5，ITK，IL2RA，LAX1，IKZF3，GBP5，CXCR6，SIRPG，CD2，CSF2RB，SLAMF7或CXCL9。

[2003] 在当前方面的优选的实施方式中，结合生物标志物的分子是结合T细胞标志物的抗体，T细胞标志物优选地选自CD3、CD4、CD8、CD25、CXCR3、CCR5和TNF受体超家族成员，包括4-1BB、OX-40、或GITR。

[2004] 在当前方面的优选的实施方式中，结合生物标志物的分子是结合干扰素或干扰素诱导蛋白的抗体，优选地选自INFγ、IL10、IL12p70、IL1β、IL2和TNFα。

[2005] 免疫检查点蛋白作为抗CCR8抗体治疗的生物标志物

[2006] 根据本发明，令人惊奇地发现，对于至少最初对ICI治疗有响应，特别是对抗PD-(L)1或CTLA4抗体治疗有响应的受试者，对使用抗CCR8抗体的(单一)疗法的响应得到改善，参见例如表12.7.1。由于PD-L1表达是对抗PD-L1抗体治疗的响应的预测指标，发明人假设PD-L1表达和检查点蛋白表达本身也可能适合直接预测抗CCR8抗体治疗的响应。这一假设可以通过PD-L1表达和抗CCR8抗体治疗响应之间的相关数据得到证实(表12.8.1)。可以如本领域已知的那样确定PD-L1表达，例如不限于使用肿瘤比例评分(TPS)、联合阳性评分(CPS)或mRNA表达。因此，发明人建议免疫检查点标志物，特别是PD-L1作为分层的替代标志物，以克服CCR8难以分析并因此难以实施的问题，以便选择最有可能受益于抗CCR8抗体治疗的患者群体。

[2007] 因此，提供了结合免疫检查点蛋白的分子，用于将受试者诊断/分级为具有对抗CCR8抗体治疗敏感的肿瘤的方法，该方法包括

[2008] a.确定肿瘤(样本)中免疫检查点蛋白的表达水平，

[2009] b.将免疫检查点蛋白表达水平与参考样本或值进行比较，以及

[2010] c.如果免疫检查点蛋白表达水平高于或等于参考样品或值，则将受试者诊断/分级为具有对抗CCR8抗体治疗敏感的肿瘤。

[2011] 此外，提供了结合免疫检查点蛋白的分子用于监测抗CCR8抗体疗法的治疗成功的用途，该方法包括

[2012] a.确定肿瘤(样本)/样本中免疫检查点蛋白的表达水平，以及

[2013] b.将免疫检查点蛋白表达水平与参考样本或值进行比较。

[2014] 结合免疫检查点蛋白的分子优选地是抗体。免疫检查点蛋白优选地为PD-1、PD-L1或CTLA4。结合免疫检查点蛋白的分子优选地是结合PD-1、PD-L1或CTLA4的抗体。例如，抗体可以是PD-L1 28-8、PD-L1 22C3、PD-L1 SP142、PD-L1 SP263或本领域已知作为伴随诊断的任何其他合适的抗体。在特别优选的实施方式中，检查点蛋白表达水平基于组合阳性评分(CPS)或肿瘤比例评分(TPS)来确定。如果免疫检查点蛋白表达存在或高，如CPS≥1，优选地

CPS≥5,最优选地CPS≥10所示,或如TPS≥1%,优选地TPS≥10%,最优选地TPS≥50%所示,则受试者或患者的肿瘤被诊断/分层为对抗CCR8抗体治疗敏感。因此,在一些优选的实施方式中,参考值是CPS=1,更优选地CPS=5或最优选地CPS=10。在一些其他或相同的优选地实施方式中,参考值是TPS=1%,更优选地TPS=10%,或最优选地TPS≥50%。

[2015] 在一些优选地实施方式中,PD-L1表达通过CPS≥1确定,优选通过CPS≥5,最优选通过CPS≥10或通过TPS≥1%,优选通过TPS≥10%,最优选通过TPS≥50%。

[2016] Treg浸润标志物作为抗CCR8抗体治疗的生物标志物

[2017] 提供了一种结合Treg浸润标志物的分子,用于将受试者诊断/分级为具有对抗CCR8抗体治疗敏感的肿瘤的方法,该方法包括

[2018] a.确定肿瘤(样品)中Treg浸润标志物的表达水平,

[2019] b.将Treg浸润标志物表达水平与参考样本或值进行比较,以及

[2020] c.如果Treg浸润标志物的水平高于或等于参考样品或值,则将受试者诊断/分级为具有对抗CCR8抗体治疗敏感的肿瘤。

[2021] Treg浸润标志物是在激活的Treg上高表达的标志物。优选地,Treg浸润标志物选自CCR8,FOXP3,ICOS,CCR4,TIGIT,P2RY10,CD80,TNFRSF9,CD3(G),SLAMF1,IL7R,IL2RB,CTLA4,CD5,ITK,IL2RA,LAX1,IKZF3,GBP5,CXCR6,SIRPG,CD2,CSF2RB,SLAMF7,CXCL9,参见表11.1.1、表12.8.1。Treg浸润标志物可以不同于CCR8。结合Treg浸润标志物的分子优选地是抗体,例如结合一种或多种Treg浸润标志物的抗体。

[2022] 本文公开的Treg浸润标志物也可用作控制治疗成功的生物标志物,例如如本文别处所述。如果获得至少40%或50%的(暂时的)Treg耗竭,例如通过将Treg浸润标志物减少2倍,则认为治疗成功。

[2023] 免疫细胞标志物作为抗CCR8抗体治疗的生物标志物

[2024] 提供了一种结合免疫细胞标志物的分子,用于将受试者诊断/分级为具有对抗CCR8抗体治疗敏感的肿瘤的方法,该方法包括

[2025] a.确定肿瘤(样本)中免疫细胞标志物的表达水平,

[2026] b.将免疫细胞标志物表达水平与参考样本或值进行比较,以及

[2027] c.如果免疫细胞标志物的水平高于或等于参考样品或值,则将受试者诊断/分级为具有对抗CCR8抗体治疗敏感的肿瘤。

[2028] 免疫细胞标志物可以是淋巴细胞、效应细胞、T细胞、细胞毒性T细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、B细胞、NK细胞或其组合的标志物。这些免疫细胞群的合适标志物在整个公开内容中有所描述。例如,合适的T细胞标志物包括CD3(例如CD3E、D和/或G)。例如,合适的细胞毒性T细胞标志物包括CD8(例如CD8A和/或B)。例如,合适的巨噬细胞标志物包括MS4A7。例如,合适的巨噬细胞M1细胞标志物包括Acod1。例如,合适的M2巨噬细胞标志物包括Mrc1。例如,合适的B细胞标志物包括CD19、CD20、CD22和/或MSA41。

[2029] 本文公开的免疫细胞标志物也可用作控制治疗成功的生物标志物,例如如本文别处所述。如果发生(暂时的)免疫细胞增加,例如至少50%,例如如免疫细胞浸润标志物增加至少2倍所示,治疗被认为是成功的。

[2030] T细胞标志物作为抗CCR8抗体治疗的生物标志物

[2031] 提供了一种结合T细胞标志物的分子,用于将受试者诊断/分级为具有对抗CCR8抗

体治疗敏感的肿瘤的方法,该方法包括

[2032] a.确定肿瘤(样本)中T细胞标志物的表达水平,

[2033] b.将T细胞标志物表达水平与参考样本或值进行比较,以及

[2034] c.如果T细胞标志物的水平高于或等于参考样品或值,则将受试者诊断/分级为具有对抗CCR8抗体治疗敏感的肿瘤。

[2035] T细胞标志物可以是在T细胞如激活的T细胞上高表达的标志物。优选地,T细胞标志物选自CD3、CD4、CD8、CD25、CXCR3、CCR5和TNF受体超家族成员,包括4-1BB、OX-40或GITR。结合T细胞标志物的分子优选地是抗体,例如结合本文公开的一种或多种T细胞标志物的抗体。

[2036] 本文公开的T细胞标志物也可单独或与Treg浸润标志物(例如如本文别处所述)组合用作控制治疗成功的生物标志物。如果发生(暂时的)T细胞增加,例如至少50%,例如如T细胞标志物增加至少2倍所示,治疗被认为是成功的。

[2037] 干扰素或干扰素诱导蛋白作为抗CCR8抗体治疗的生物标志物

[2038] 提供了一种干扰素或干扰素诱导蛋白,用于将受试者诊断/分级为具有对抗CCR8抗体治疗敏感的肿瘤或用于监测治疗成功的方法,该方法包括

[2039] a.确定肿瘤(样品)中干扰素或干扰素诱导蛋白的水平,

[2040] b.将干扰素或干扰素诱导蛋白的水平与参考样品或值进行比较,以及

[2041] c.如果干扰素或干扰素诱导蛋白的水平高于或等于参考样品或值,则将受试者诊断/分层为具有对抗CCR8抗体治疗敏感的肿瘤。

[2042] 干扰素或干扰素诱导蛋白优选选自IFNγ、IL10、IL12p70、IL1β、IL2和TNFα。根据本发明,发现CCR8 mRNA表达与炎症标志物IFNγ的相关性对于50种肿瘤适应症是显著的,参见表11.1.2。由此可以得出结论,IFNγ水平可适合作为本文公开的生物标志物。这已得到证实,例如在实施例12.6.2中,IFNγ和TNFα水平与治疗响应相关。在不同的实验中(实施例12.6.6),增加的IFNγ、IL-1b和IL-2水平与改善的功效相关。合适的干扰素刺激基因或蛋白包括但不限于ACOD1,ACTG1,ACTR2,ACTR3,ADAMTS13,AIF1,AQP4,ASS1,B2M,BST2,C9JQL5,CALCOCO2,CAMK2A,CAMK2B,CAMK2D,CAMK2G,CASP1,CCL1,CCL11,CCL13,CCL14,CCL15,CCL15,CCL14,CCL16,CCL17,CCL18,CCL19,CCL2,CCL20,CCL21,CCL22,CCL23,CCL24,CCL25,CCL26,CCL3,CCL3L1,CCL4,CCL4L1,CCL5,CCL7,CCL8,CD40,CD44,CD58,CDC42EP2,CDC42EP4,CIITA,CITED1,CLDN1,CX3CL1,CXCL16,CYP27B1 DAPK1,DAPK3,EDN1,EPRS,EVL,FCGR1A,FCGR1B,FLNB,GAPDH,GBP 1,GBP2,GBP4,GBP5,GBP6,GCH1,GSN,HCK,HLA-A,HLA-B,HLA-C,HLA-DPA1,HLA-DPB1,HLA-DQA1,HLA-DQA2,HLA-DQB1,HLA-DQB2,HLA-DRA HLA-DRB1,HLA-DRB3,HLA-DRB4,HLA-DRB5,HLA-E,HLA-F,HLA-G,HLA-H,ICAM1,IFI30,IFITM1,IFITM2,IFITM3,IFNG,IFNGR1,IFNGR2,IL12B,IL12RB1IL23R,IRF1,IRF2,IRF3,IRF4,IRF5,IRF6,IRF7,IRF8,IRF9,JAK1,JAK2,KIF16B,KIF5B,KYNU,LGALS9,MEFV,MID1,MRC1,MT2A,MYO1C,NCAM1,NMI,NOS2,NUB1,OAS1,OAS2,OAS3,OASL,PDE12,PML,PRKCD,PTAFR,RAB12,RAB20,RAB43,RAB7B,RPL13A,RPS6KB1 RYDEN,SEC61A1 SLC11A1 SLC26A6 SLC30A8 SNCA,SP100,STAR,STAT1,STX4,STX8,STXBP1,STXBP2,STXBP3,STXBP4,SYNCRIP TDGF1,TLR2,TLR3,TLR4,TRIM21,TRIM22,TRIM25,TRIM26,TRIM31,TRIM34,TRIM38,TRIM5,TRIM62,TRIM68,TRIM8,UBD,VAMP3,VCAM1,VIM,VPS26B,WAS,WNT5A,XCL1,XCL2,ZYX。

实施例

[2043] 实施例1:比对CC趋化因子受体和CXC趋化因子受体

[2044] 从Uniprot检索人类CC和CXC趋化因子受体序列并用Clustal Omega比对。结果导入Jalview进行可视化(图1)。带负电荷的氨基酸残基E和D(灰色),以及酪氨酸残基(Y,深灰色)和半胱氨酸残基(C,浅灰色)被突出显示。虽然N端结构域在序列上有偏差,但它们的特点是具有相对较多的带负电荷的氨基酸和酪氨酸残基。

[2045] 实施例2:人、食蟹猴和鼠CCR8的比对

[2046] 从Uniprot检索人CCR8、食蟹猴CCR8和鼠CCR8序列并用Clustal Omega比对。将结果导入Jalview以进行序列同一性的可视化和计算,参见图2a。虽然人和食蟹猴CCR8的成对比对产生94.37%的序列同一性,但小鼠和人CCR8之间的百分比(百分比ID=70.99)以及小鼠和食蟹猴CCR8之间的百分比(百分比ID=71.55)要低得多。在N端(TRD)区域和C端区域中可以观察到实质性差异。

[2047] 食蟹猴TRD与人TRD的序列同源性为68%,鼠TRD与人TRD的序列同源性为52%。然而,酸性和酪氨酸硫酸化TRD显示带负电荷的簇,其成功用于产生交叉反应抗体,参见实施例6。至少发现MDYT和YYPD基序在物种之间是保守的。

[2048] 实施例3:对特异性结合CCR8的现有技术抗体的评估

[2049] 使用表达CCR8的细胞系进行FACS实验,以评估特异性结合CCR8和CCR8染色而市售销售的多种现有技术抗体。小鼠T淋巴瘤细胞系BW5147.4表达鼠CCR8和人皮肤T淋巴瘤,HuT78表达低水平人CCR8。趋化因子受体的现有技术抗体,特别是CCR8的抗体通常具有低特异性,例如Xing et al.,Appl IHC Mol Morphol(2015):“依据我们的经验和如其他人之前发表的,由于可用抗体缺乏特异性,我们无法通过免疫组织化学评估CCR8表达。”,Chenivesse et al.,JI(2012):“我们无法评估CCL 18对$CD^{4+}CCR^{8+}$细胞的吸引力,因为所有市售的抗CCR8抗体都缺乏特异性,这不允许细胞分选,至少在我们手中是这样。”,或Pease,Biochem J(2011):“由于缺乏针对人CCR8的看似可靠的抗体,后者一直存在问题。例如,在一项检查CCR8在CD4+CD25+ Treg群体上的表达的研究中,使用市售抗体无法检测到CCR8表面染色,尽管如CCL1驱动的微丝聚合所评估这些细胞明显表达功能性CCR8。”(cf.Xing,Xiaoming,et al."Expression of the chemokine receptor gene,CCR8,is associated With DUSP22 rearrangements in anaplastic large cell lymphoma."Applied immunohistochemistry&molecular morphology:AIMM/official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry 23.8(2015):580;Chenivesse,Cécile,et al."Pulmonary CCL18 recruits human regulatory T cells."The Journal of Immunology 189.1(2012):128-137.;和Pease,James E."Targeting chemokine receptors in allergic disease."Biochemical Journal 434.1(2011):11-24.)。

[2050] 表3.1列出了三种经过分析的市售抗体,它们在发明人手中并未特异性染色CCR8(参见图3)。大鼠IgG2B克隆#191704(MAB1429,R&D systems)未显示人CCR8的特异性结合,这也与WO2007044756的实施例6中描述的观察结果一致。Abcam E77显示出非常微弱的信号和高背景(数据未显示)。MM0068-4G19(Abcam)、191704(R&D Systems)、4G19(Bioaol(Genetex))以及11n24和10k39(均为antikoerper-online.de)在发明人手中未显示出与人CCR8的特异性结合。

[2051] 表3.1:选择的现有技术抗体,cf.图3.

[2052]

供应商	**血管蛋白质组学 (Angioproteomie)**	**R&D**	**R&D**
Item	大鼠抗人 CCR8 [MM0068-4G19]	单抗大鼠抗人 CCR8 Ab	重组单抗兔 IgG 克隆 # 1055C
目录号	hAP-0068	MAB1429-100	MAB8324
免疫原	人 CCR8 转染的 293 细胞	转染人 CCR8 的 BaF3 小鼠前 B 细胞系 Met1-Leu355	转染小鼠 CCR8 的 HEK293 人胚胎肾细胞系

[2053]

		Accession # P51685	
反应性	人	人	小鼠
抗原	CCR8	CCR8	CCR8
应用	FACS	中和 CCL1 诱导的趋化性 ND_{50} 0.01-0.05 μg/mL	用小鼠 CCR8 转染子而非无关转染子进行 FACS 染色
宿主	大鼠	大鼠	兔
同种型	大鼠 IgG2	大鼠 IgG_{2B} 克隆 # 191704	克隆 # 1055C

[2054] 发明人在现有技术中仅发现两种可靠的特异性结合人CCR8的单克隆抗体:ICOS开发并最初公开于WO2007044756的克隆433H和Biolegend提供和销售的L263G8。两种抗体都是使用过表达人CCR8的细胞作为免疫原产生的。L263G8不与鼠CCR8发生交叉反应,并且不与BW5147.3细胞或转染有mCCR8的HEK 293T细胞中的鼠CCR8结合。

[2055] 单克隆大鼠IgG2b,κ抗小鼠CCR8克隆SA214G2(Biolegend目录号150302)对表达鼠CCR8的BW5147.4细胞染色呈阳性。该抗体是基于转染鼠CCR8的细胞产生的。

[2056] 总之,特异性识别人CC趋化因子受体的抗体对于该目标类别的一些成员来说是罕见的。低比率与针对人趋化因子受体的出售的其他市售抗体的结果一致。

[2057] 实施例4:CC和CXC趋化因子受体的抗原

[2058] 因为关于酪氨酸硫酸化的文献不完整且部分矛盾(例如在物种之间),发明人使用各种可用的工具、文献搜索和自己的经验来预测硫酸化位点。表4.1总结了适合作为抗原以获得针对各个趋化因子受体的改进抗体的所得多肽。这些抗原已成功用于抗体产生,例如如随后的实施例所示,作为抗原或用于脱靶淘选。通过应用根据Monigatti F.et al.(Monigatti,Flavio,et al."The Sulfinator:predicting tyrosine sulfation sites in protein sequences."Bioinformatics 18.5(2002):769-770.)的算法用55的E-截止值确认了带下划线的硫酸化位点。这些序列以前都没有包含在隐马尔可夫模型的训练集中。

[2059] 括号中酪氨酸的硫酸化可以省略。对于人CCR3和人CCR8,预测Y172和Y353分别有另外的硫酸化位点。对于猴CCR3和猴CCR2,预测Y172和Y188分别有另外的硫酸化位点。以粗体显示的硫酸化位点先前已在文献中描述过(cf.Liu,Justin,et al."Tyrosine sulfation is prevalent in human chemokine receptors important in lung disease."American j ournal of respiratory cell and molecular biology 38.6(2008):738-743;Millard;Christopher J.,et al."Structural basis of receptor

sulfotyrosine recognition by a CC chemokine:the N-terminal region of CCR3 bound to CCL11/eotaxin-1."Structure 22.11(2014):1571-1581)。

[2060] 多肽设计

[2061] CCR8的N端由人和食蟹猴CCR8全长蛋白中的第1至35位氨基酸以及小鼠CCR8全长蛋白中的第1至33位氨基酸形成。N端由以半胱氨酸连接的TRD(人和食蟹猴CCR8的氨基酸1-24和小鼠CCR8的氨基酸1-22)和LID结构域(人和食蟹猴CCR8的氨基酸26-35和小鼠CCR8的氨基酸24-33)组成。对于包含N端的多肽的合成,将半胱氨酸替换为丝氨酸以避免肽聚集。表5.1显示了用于通过如实施例6中所述的噬菌体展示淘选产生抗CCR8抗体的多肽的各自ID。为了测试蛋白质的翻译后修饰是否导致抗体产生困难,使用未修饰或硫酸化的包含TRD和/N端序列的肽。在食蟹猴和人CCR8的TRD的至少50%的酪氨酸上引入了硫酸化,例如在相应肽的位置3、15和17上。对于小鼠TRD和N端肽,在相应肽的第3、14和15位酪氨酸上引入硫酸化(参见表6.1)。此外,包含通过引入C端生物素化进行工程化的LID的肽,所述生物素化通过TTDS(三氧杂十三烷-琥珀酰胺酸)接头连接。也可以使用其他标签和接头。TRD或N端的肽通过引入由TTDS-赖氨酸接头连接的N端生物素化进行修饰。同样,另外已知的接头和/或标签同样可以用于促进肽的固定。

[2062]

表 4.1：用于抗原或脱靶淘选以产生趋化因子受体抗体的多肽。根据本发明，在多肽的所列酪氨酸位置之一处至少有一个硫酸化是必需的，但是在两个、三个或更多个位点处的硫酸化也是可能的并且可能是有益的。X可以是任何氨基酸或不是氨基酸，优选地是不同于半胱氨酸的氨基酸，例如丝氨酸。

SEQ ID NO:	抗原	物种	结构域	硫酸化位点	序列	长度	另外地修饰（任选地）
1	CCR1	人	TRD	Y10, Y18	METPNTTEDYDTTTEFDYGDATP	23	N端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
2	CCR1	MACFA	TRD	Y10, Y18	METPDTTENYDMITEFDYGDATP	23	N端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
3	CCR1	小鼠	TRD	Y10, Y18	MEISDFTEAYPTTTEFDYGDSTP	23	N端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
4	CCR1	人	N端	Y10, Y18	METPNTTEDYDTTTEFDYGDATP XQKVNERAFGA	34	N端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)；C24S (以避免聚集)
5	CCR1	MACFA	N端	Y10, Y18	METPDTTENYDMITEFDYGDATP XHKVNERAILA	34	N-端 inal biotinylation (e.g. via TTDS_Lysin linker); C24S (以避免聚集)
6	CCR1	小鼠	N端	Y10, Y18	MEISDFTEAYPTTTEFDYGDSTPX QKTAVRAFGA	34	N端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C24S (以避免聚集)

[2063]

7	CCR2	人	TRD	**Y26**, Y28	MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFD YDYGAP	31	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
8	CCR2	MACMU	TRD	Y26, Y28	MLSTSRSRFIRNTNGSGEEVTTFF DYDYGAP	31	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
9	CCR2	小鼠	TRD	Y37, Y39	MEDNNMLPQFIHGILSTSHSLFTR SIQELDEGATTPYDYDDGEP	44	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
10	CCR2	人	N 端	**Y26**, Y28	MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFD YDYGAPXHKFDVKQIGA	42	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C32S （以避免聚集）
11	CCR2	MACMU	N 端	Y26, Y28	MLSTSRSRFIRNTNGSGEEVTTFF DYDYGAPXHKFDVKQIGA	42	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C32S （以避免聚集）
12	CCR2	小鼠	N 端	Y37, Y39	MEDNNMLPQFIHGILSTSHSLFTR SIQELDEGATTPYDYDDGEPXHKT SVKQIGA	55	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C45S （以避免聚集）
13	CCR3	人	TRD	Y16, Y17	MTTSLDTVETFGTTSYYDDVGLL	23	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
14	CCR3	MACFA	TRD	Y16	MTTSLDTVETFGPTSYDDDMGLL	23	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
15	CCR3	小鼠	TRD	Y20, Y22	MAFNTDEIKTVVESFETTPYEYE WAPP	27	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
16	CCR3	人	N 端	Y16, Y17	MTTSLDTVETFGTTSYYDDVGLL XEKADTRALMA	34	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C24S (以避免聚集)
17	CCR3	MACFA	N 端	Y16	MTTSLDTVETFGPTSYDDDMGLL XEKADVGALIA	34	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C24S (以避免聚集)
18	CCR3	小鼠	N 端	**Y20, Y22**	MAFNTDEIKTVVESFETTPYEYE WAPPXEKVRIKELGS	38	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C28S （以避免聚集）

[2064]

119	CCR4	人	TRD	(Y16, Y19, Y20), Y22	MNPTDIADTTLDESIYSNYYLYESI PKP	28	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
220	CCR4	MACFA	TRD	(Y16, Y19, Y20), Y22	MNPTDIADTTLDESIYSNYYLYESI PKP	28	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
221	CCR4	小鼠	TRD	(Y16, Y19, Y20), Y22	MNATEVTDTTQDETVYNSYYFYE SMPKP	28	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
222	CCR4	人	N 端	(Y16, Y19, Y20), Y22	MNPTDIADTTLDESIYSNYYLYESI PKPXTKEGIKAFGE	39	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C29S （以避免聚集）
223	CCR4	MACFA	N 端	(Y16, Y19, Y20), Y22	MNPTDIADTTLDESIYSNYYLYESI PKPXTKEGIKAFGE	39	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C29S （以避免聚集）
224	CCR4	小鼠	N 端	(Y16, Y19, Y20), Y22	MNATEVTDTTQDETVYNSYYFYE SMPKPXTKEGIKAFGE	39	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C29S （以避免聚集）
2	CCR5	人	TRD	**Y3, Y10,**	MDYQVSSPIYDINYYTSEP	19	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接

[2065]

5				**(Y14, Y15**		头)
2 6	CCR5	MACFA	TRD	Y3, Y10, Y14, Y15	MDYQVSSPTYDIDYYTSEP	19	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
2 7	CCR5	小鼠	TRD	Y10, Y12, Y16	MDFQGSVPTYSYDIDYGMSAP	21	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
2 8	CCR5	人	N 端	**Y3, Y10, Y14, Y15**	MDYQVSSPIYDINYYTSEPXQKIN VKQIAA	30	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C20S （以避免聚集）
2 9	CCR5	MACFA	N 端	Y3, Y10, Y14, Y15	MDYQVSSPTYDIDYYTSEPXQKIN VKQIAA	30	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C20S （以避免聚集）
3 0	CCR5	小鼠	N 端	Y10, Y12, Y16	MDFQGSVPTYSYDIDYGMSAPXQ KINVKQIAA	32	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C22S （以避免聚集）
3 1	CCR6	人	TRD	Y18, Y26, Y27	MSGESMNFSDVFDSSEDYFVSVN TSYYSVDSEMLL	35	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
3 2	CCR6	MACFA	TRD	Y23, Y31, Y32	MFLPTMSGESMNFSDVFDSSEDY FASVNTSYYTVDSEMLL	40	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
3 3	CCR6	小鼠	TRD	(Y7), Y13, Y18, Y19	MNSTESYFGTDDYDNTEYYSIPPD HGP	27	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
3 4	CCR6	人	N 端	Y18, Y26, Y27	MSGESMNFSDVFDSSEDYFVSVN TSYYSVDSEMLLXSLQEVRQFSRL	47	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C36S （以避免聚集）
3 5	CCR6	MACFA	N 端	Y23, Y31, Y32	MFLPTMSGESMNFSDVFDSSEDY FASVNTSYYTVDSEMLLXTLHEV RQFSRL	52	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C41S （以避免聚集）
3	CCR6	小鼠	N 端	(Y7),	MNSTESYFGTDDYDNTEYYSIPPD	39	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接

[2066]

6				Y13, Y18, Y19	HGPXSLEEVRNFTKV		头); C28S （以避免聚集）
37	CCR7	人	TRD	Y8, Y17	QDEVTDDYIGDNTTVDYTLFESL	23	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
38	CCR7	MACFA	TRD	Y8, Y17	QDEVTDDYIGDNTTVDYTLFESL	23	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
39	CCR7	小鼠	TRD	Y8, Y17, Y20	QDEVTDDYIGENTTVDYTLYESV	23	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
40	CCR7	人	N 端 w/o Signal Peptide	Y8, Y17	QDEVTDDYIGDNTTVDYTLFESL XSKKDVRNFKAW	35	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C24S (以避免聚集)
41	CCR7	MACFA	N 端 w/o Signal Peptide	Y8, Y17	QDEVTDDYIGDNTTVDYTLFESL XSKKDVRNFKAW	35	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C24S (以避免聚集)
42	CCR7	小鼠	N 端 w/o Signal Peptide	Y8, Y17, Y20	QDEVTDDYIGENTTVDYTLYESV XFKKDVRNFKAW	35	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C24S (以避免聚集)
43	CCR8	人	TRD	Y3, Y15, (16), Y17	MDYTLDLSVTTVTDYYYPDIFSSP	24	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
44	CCR8	MACFA	TRD	Y3, Y15, (16), Y17	MDYTLDPSMTTMTDYYYPDSLSS P	24	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
4	CCR8	小鼠	TRD	Y3, **Y14,**	MDYTMEPNVTMTDYYPDFFTAP	22	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接

[2067]

5				**Y15**			头)
46	CCR8	人	N 端	Y3, Y15, (16), Y17	MDYTLDLSVTTVTDYYYPDIFSSP XDAELIQTNGK	35	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C25S （以避免聚集）
47	CCR8	MACFA	N 端	Y3, Y15, (16), Y17	MDYTLDPSMTTMTDYYYPDSLSS PXDGELIQRNDK	35	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C25S （以避免聚集）
48	CCR8	小鼠	N 端	Y3, **Y14, Y15**	MDYTMEPNVTMTDYYPDFFTAP XDAEFLLRGSM	33	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C23S （以避免聚集）
49	CCR8	人	LID		DAELIQTNGK	10	NA
50	CCR8	MACFA	LID		DGELIQRNDK	10	NA
51	CCR8	小鼠	LID		DAEFLLRGSM	10	NA
52	CCR8	人	ECL1		YLLDQWVFGTVMCK	14	NA
53	CCR8	MACFA	ECL1		YQLDQWVFGTVMCK	14	NA
54	CCR8	小鼠	ECL1		NLLDQWVFGTAMCK	14	NA
55	CCR8	人	ECL2		YQVASEDGVLQCYSFYNQQTLK WKIFTNFKM	31	NA
56	CCR8	MACFA	ECL2		YQVASEDGVLQCYSFYNQQTLK WKIFTNFEM	31	NA
57	CCR8	小鼠	ECL2		YQVASEDGMLQCFQFYEEQSLR WKLFTHFEI	31	NA

[2068]

58	CCR8	人	ECL3		HSMHILDGCSISQQLTY	17	NA
59	CCR8	MACFA	ECL3		HSMHILDGCSISQQLNY	17	NA
60	CCR8	小鼠	ECL3		HDLHILDGCATRQRLAL	17	NA
61	CCR9	人	TRD	Y17, Y28, Y37	MTPTDFTSPIPNMADDYGSESTSS MEDYVNFNFNFTDFY	37	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
62	CCR9	MACFA	TRD	Y17, Y28, Y37	MTPTEFTSPVPNMADDYGSESTSS MEDYVNFNFNFTDFY	37	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
63	CCR9	小鼠	TRD	Y19, Y28	MTPTEFTSPVPNMADDYGSESTSS MEDYVNFNFNFTDFY	37	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
64	CCR9	人	N 端	Y17, Y28, Y37	MTPTDFTSPIPNMADDYGSESTSS MEDYVNFNFNFTDFYXEKNNVRQF AS	48	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C38S （以避免聚集）
65	CCR9	MACFA	N 端	Y17, Y28, Y37	MTPTEFTSPVPNMADDYGSESTSS MEDYVNFNFNFTDFYXEKNNVRQF AS	48	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C38S （以避免聚集）
66	CCR9	小鼠	N 端	Y19, Y28	MTPTEFTSPVPNMADDYGSESTSS MEDYVNFNFNFTDFYXEKNNVRQF AS	48	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C38S （以避免聚集）
67	CCR10	人	TRD	Y14, Y22	MGTEATEQVSWGHYSGDEEDAY SAEPLPEL	30	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
68	CCR10	MACFA	TRD	Y14, Y22	MGTEATEQVSWGHYSGDEEEAY SAEPLPEL	30	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)

[2069]

696	CCR10	小鼠	TRD	Y14, Y17, Y22	MGTKPTEQVSWGLYSGYDEEAY SVGPLPEL	30	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
700	CCR10	人	N 端	Y14, Y22	MGTEATEQVSWGHYSGDEEDAY SAEPLPELXYKADVQAFSRAFQPS VSLTVA	52	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C31S （以避免聚集）
710	CCR10	MACFA	N 端	Y14, Y22	MGTEATEQVSWGHYSGDEEEAY SAEPLPELXYKADVQAFSRAFQPS VSLTVA	52	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C31S （以避免聚集）
720	CCR10	小鼠	N 端	Y14, Y17, Y22	MGTKPTEQVSWGLYSGYDEEAY SVGPLPELXYKADVQAFSRAFQPS VS	48	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C31S （以避免聚集）
733	CXCR1	人	TRD	Y27	MSNITDPQMWDFDDLNFTGMPPA DEDYSP	29	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
744	CXCR1	MACFA	TRD	Y14, Y28	MSNATDPQMGDDDYDLNFTGMP PTDEDYSP	30	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
755	CXCR1	小鼠	TRD	<u>Y6</u>, Y32	MAEAEYFIWTNPEGDFEKEFGNIT GMLPTGDYFIP	35	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
766	CXCR1	人	N 端	Y27	MSNITDPQMWDFDDLNFTGMPPA DEDYSPXMLETETLNK	39	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C30S （以避免聚集）
777	CXCR1	MACFA	N 端	Y14, Y28	MSNATDPQMGDDDYDLNFTGMP PTDEDYSPXRLETQSLNK	40	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C31S （以避免聚集）
788	CXCR1	小鼠	N 端	<u>Y6</u>, Y32	MAEAEYFIWTNPEGDFEKEFGNIT GMLPTGDYFIPXKRVPITNR	44	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C36S （以避免聚集）
799	CXCR2	人	TRD	Y23, Y25	MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNY SYSSTLPPFLLDAAP	38	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)

[2070]

80	CXCR2	MACMU	TRD	Y20, Y22	FNMESDSFEDLWKGEDFSNYSYSSDLPPSLPDVAP	35	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
81	CXCR2	小鼠	TRD	Y24	MGEFKVDKFNIEDFFSGDLDIFNYSSGMPSILPDAVP	37	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
82	CXCR2	人	N 端	Y23, Y25	MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLLDAAPXEPESLEINK	48	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C39S （以避免聚集）
83	CXCR2	MACMU	N 端	Y20, Y22	FNMESDSFEDLWKGEDFSNYSYSSDLPPSLPDVAPXRPESLEINK	45	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C36S （以避免聚集）
84	CXCR2	小鼠	N 端	Y24	MGEFKVDKFNIEDFFSGDLDIFNYSSGMPSILPDAVPXHSENLEINS	47	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C38S （以避免聚集）
85	CXCR3	人	TRD	<u>Y27, Y29</u>	MVLEVSDHQVLNDAEVAALLENFSSSYDYGENESDS	36	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
86	CXCR3	MACFA	TRD	Y27, Y29	MVLEVSDHQVLNDAEVAALLENFSSSYDYGENESDS	36	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
87	CXCR3	小鼠	TRD	Y2, <u>Y27, Y29</u>	MYLEVSERQVLDASDFAFLLENSTSPYDYGENESDFSDSPP	41	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
88	CXCR3	人	N 端	<u>Y27, Y29</u>	MVLEVSDHQVLNDAEVAALLENFSSSYDYGENESDSXXTSPP	42	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C37S, C38S （以避免聚集）
89	CXCR3	MACFA	N 端	Y27, Y29	MVLEVSDHQVLNDAEVAALLENFSSSYDYGENESDSXXTSPP	42	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C37S, C38S （以避免聚集）
90	CXCR3	小鼠	N 端	Y2, <u>Y27, Y29</u>	MYLEVSERQVLDASDFAFLLENSTSPYDYGENESDFSDSPPXPQDFSLNFDR	52	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C42S （以避免聚集）
91	CXCR4	人	TRD	(Y7), **<u>Y12, Y21</u>**	MEGISIYTSDNYTEEMGSGDYDSMKEP	27	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)

[2071]

92	CXCR4	MACFA	TRD	(Y7), Y12, Y21	MEGISIYTSDNYTEEMGSGDYDSIKEP	27	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
93	CXCR4	小鼠	TRD	Y9, Y14, Y23	MEPISVSIYTSDNYSEEVGSGDYDSNKEP	29	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
94	CXCR4	人	N 端	(Y7), **Y12, Y21**	MEGISIYTSDNYTEEMGSGDYDSMKEPXFREENANFNK	38	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C28S （以避免聚集）
95	CXCR4	MACFA	N 端	(Y7), Y12, Y21	MEGISIYTSDNYTEEMGSGDYDSIKEPXFREENAHFNR	38	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C28S （以避免聚集）
96	CXCR4	小鼠	N 端	Y9, Y14, Y23	MEPISVSIYTSDNYSEEVGSGDYDSNKEPXFRDENVHFNR	40	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C30S （以避免聚集）
97	CXCR5	人	TRD	Y3, Y27	MNYPLTLEMDLENLEDLFWELDRLDNYNDTSLVENHL	37	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
98	CXCR5	MACFA	TRD	Y3, Y27	MNYPLMLEMDLENLEDLFLEFDKFDNYNDTSLVENHL	37	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
99	CXCR5	小鼠	TRD	Y3, Y14, Y20, Y26	MNYPLTLDMGSITYNMDDLYKELAFYSNSTEIPLQDSNF	39	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
100	CXCR5	人	N 端	Y3, Y27	MNYPLTLEMDLENLEDLFWELDRLDNYNDTSLVENHLXPATEGPLMASFKAVFVP	55	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C38S （以避免聚集）
101	CXCR5	MACFA	N 端	Y3, Y27	MNYPLMLEMDLENLEDLFLEFDKFDNYNDTSLVENHLXPATEGPLMASFKAVFVP	55	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C38S （以避免聚集）
102	CXCR5	小鼠	N 端	Y3, Y14, Y20, Y26	MNYPLTLDMGSITYNMDDLYKELAFYSNSTEIPLQDSNFXSTVEGPLLTSFKAVFMP	57	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C40S （以避免聚集）

[2072]

1003	CXCR6	人	TRD	Y6, Y10	MAEHDYHEDYGFSSFNDSSQEEHQDFLQFSKV	32	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
1004	CXCR6	MACFA	TRD	Y4, Y7, Y39	MAEYDHYEDDGFLNSFNDSSQEEHQDFLQFRKV	33	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
1005	CXCR6	小鼠	TRD	Y11, (Y15)	MDDGHQESALYDGHYEGDFWLFNNSSDNSQENKRFLKFKEV	41	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
1006	CXCR6	人	N 端	Y6, Y10	MAEHDYHEDYGFSSFNDSSQEEHQDFLQFSKVFLPXMYLVVFV	43	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C33S （以避免聚集）
1007	CXCR6	MACFA	N 端	Y4, Y7, Y39	MAEYDHYEDDGFLNSFNDSSQEEHQDFLQFRKVFLPXMYLVVFV	44	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C34S （以避免聚集）
1008	CXCR6	小鼠	N 端	Y11, (Y15)	MDDGHQESALYDGHYEGDFWLFNNSSDNSQENKRFLKFKEVFLPX	45	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C42S （以避免聚集）
1577	CX3CR1	人	TRD	Y14	MDQFPESVTENFEYDDLAEA	20	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
1578	CX3CR1	MACFA	TRD	Y20	LRNVEANFLGFLLPLLIMSY	20	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
1	CX3C	小 鼠	TRD	Y15	MSTSFPELDLENFEYDDSAEA	21	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接

[2073]

59	R1						头)
1606	CX3CR1	人	N端	Y14, Y22	MDQFPESVTENFEYDDLAEAXYIGDIVVFGT	31	N端生物素化(例如，通过TTDS赖氨酸接头); C21S（以避免聚集）
1611	CX3CR1	MACFA	N端	Y20, Y22	LRNVEANFLGFLLPLLIMSYXYFRIIQTLFS	31	N端生物素化(例如，通过TTDS赖氨酸接头); C21S（以避免聚集）
1612	CX3CR1	小鼠	N端	Y15, Y23	MSTSFPELDLENFEYDDSAEAXYLGDIVAFGT	32	N端生物素化(例如，通过TTDS赖氨酸接头); C22S（以避免聚集）
1613	CXCR1	人	TRD	Y27	MSNITDPQMWDFDDLNFTGMPPADEDYSP	29	N端生物素化(例如，通过TTDS赖氨酸接头)
1614	CXCR1	MACMU	TRD	Y14, Y28	MSNATDPQMGDDDYDLNFTGMPPTDEDYSP	30	N端生物素化(例如，通过TTDS赖氨酸接头)
1615	CXCR1	小鼠	TRD	Y6, Y32	MAEAEYFIWTNPEGDFEKEFGNITGMLPTGDYFIP	35	N端生物素化(例如，通过TTDS赖氨酸接头)
1616	CXCR1	人	N端	Y27	MSNITDPQMWDFDDLNFTGMPPADEDYSPXMLETETLNK	39	N端生物素化(例如，通过TTDS赖氨酸接头); C30S（以避免聚集）
1616	CXCR1	MACMU	N端	Y14, Y28, Y41	MSNATDPQMGDDDYDLNFTGMPPTDEDYSPXRLETQSLNKYVVIVT	46	N端生物素化(例如，通过TTDS赖氨酸接头); C31S（以避免聚集）

[2074]

7								
1168	CXCR1	小鼠	N 端	Y6, Y32	MAEAEYFIWTNPEGDFEKEFGNITGMLPTGDYFIPXKRVPITNR		44	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C36S （以避免聚集）

表 5.1: 针对 CCR8 作为靶点合成的多肽

[2075]

ID	抗原	物种	结构域	硫酸化	另外的修饰
TPP-13798	CCR8	cyno	Lid	---	C 端生物素化（例如，通过 TTDS 接头）
TPP-13796	CCR8	人	Lid	---	C 端生物素化（例如，通过 TTDS 接头）
TPP-13797	CCR8	小鼠	Lid	---	C 端生物素化（例如，通过 TTDS 接头）
TPP-13794	CCR8	cyno	TRD	---	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
TPP-13795	CCR8	cyno	TRD	Y3, Y15, Y17	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
TPP-13791	CCR8	人	TRD	---	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
TPP-13792	CCR8	小鼠	TRD	---	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
TPP-13793	CCR8	小鼠	TRD	Y3, Y14, Y15	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头)
TPP-13965	CCR8	cyno	N-term	---	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C25S （以避免聚集）
TPP-14828	CCR8	cyno	N 端	Y3, Y15, Y17	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C25S （以避免聚集）
TPP-13963	CCR8	人	N 端	---	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C25S （以避免聚集）
TPP-14827	CCR8	人	N 端	Y3, Y15, Y17	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C25S （以避免聚集）
TPP-13964	CCR8	小鼠	N 端	---	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C23S （以避免聚集）
TPP-14830	CCR8	小鼠	N 端	Y3, Y14, Y15	N 端生物素化 (例如，通过 TTDS 赖氨酸接头); C23S （以避免聚集）

[2076] 为了测试蛋白质的翻译后修饰是否导致抗体产生困难，使用未修饰或硫酸化的包含TRD和/N端序列的肽。在食蟹猴和人CCR8的TRD的至少50％的酪氨酸上引入了硫酸化，例

如在相应肽的位置3、15和17上。对于小鼠TRD和N端肽，在相应肽的第3、14和15位酪氨酸上引入硫酸化(参见表6.1)。此外，包含通过引入C端生物素化进行工程化的LID的肽，所述生物素化通过TTDS(三氧杂十三烷-琥珀酰胺酸)接头连接。也可以使用其他标签和接头。TRD或N端的肽通过引入由TTDS-赖氨酸接头连接的N端生物素化进行修饰。同样，另外已知的接头和/或标签同样可以用于促进肽的固定。

[2077] 多肽合成

[2078] 肽可以从不同的商业来源获得并且可以如本领域已知的那样制备，例如使用标准的Fmoc固相肽合成(SPPS)化学。硫酸化肽的有效合成在技术上具有挑战性，因为酪氨酸硫酸化肽在碱性条件下是稳定的，而磺基酪氨酸在酸性条件下会发生脱硫作用，这使得简单地将FmocTyr(SO3Na)OH逐步掺入生长的肽中是不合适的。肽的整体硫酸化是可能的，例如使用三氧化硫-吡啶，但不允许对选定的酪氨酸进行特定硫酸化。然而，基于Fmoc的SSPS仍可用于合成硫酸化肽。为此，正交保护的酪氨酸衍生物如氟硫酸化酪氨酸、叠氮甲基保护的酪氨酸或新戊基保护的酪氨酸可用于掺入。受保护的酪氨酸可以随后以选择性和定量的方式被揭露。

[2079] Chen等，Angew Chem，2016报道了Fmoc-氟硫酸化酪氨酸的一步合成。然后引入了一种有效的Fmoc固相肽合成策略，用于将氟硫酸化酪氨酸残基掺入目标肽中。标准的同时肽树脂裂解和酸不稳定侧链保护基团的去除提供了含有氟硫酸化酪氨酸的粗肽。碱性乙二醇作为溶剂和反应物将氟硫酸化酪氨酸肽高产率地转化为磺基酪氨酸肽。

[2080] 产生的肽可以随后如本领域已知的那样纯化，例如通过HPLC，例如在BEH C-18(Waters)或Kinetex C-18(Phenomenex)色谱柱上，可以通过质谱法(IonSpray和正离子检测器)进行分析，例如用于质量控制。

[2081] 在文献中，全长人CCR8蛋白中的两个二硫桥已被描述为通过位置106和183上的半胱氨酸连接细胞外环1(ECL1)和细胞外环2(ECL2)。半胱氨酸25和272之间的另一个二硫键被假设将第7个跨膜螺旋与N端连接起来。然而，预期实施例的肽不会在半胱氨酸之间形成任何二硫键。

[2082] 实施例6:噬菌体展示和人抗CCR8抗体筛选

[2083] 全人抗体噬菌体展示文库(BioInvent n-CoDeR Fab入文库)用于通过针对可溶性生物素化肽的选择来分离人单克隆抗体。肽由Pepscan提供。肽的合成如实施例5中所述进行。对于淘选程序应用以下方案。

[2084] 表6.1:包括用于通过噬菌体展示和ELISA筛选进行抗体选择的修饰的肽的列表。

[2085]

ID	抗原	物种	结构域	硫酸化	另外的修饰
TPP-14828	CCR8	cyno	N 端	Y3, Y15, Y17	通过 TTDS 赖氨酸接头的 N 端生物素化; C25S (以避免聚集)
TPP-14827	CCR8	人	N 端	Y3, Y15, Y17	通过 TTDS 赖氨酸接头的 N 端生物素化; C25S (以避免聚集)
TPP-14829 (脱靶)	CCR4	人	N 端	Y22	通过 TTDS 赖氨酸接头的 N 端生物素化; C29S (以避免聚集)

[2086] 链霉偶联的Dynabeads M-280(Invitrogen™)在室温(RT)下分别用生物素化肽(1管)和生物素化脱靶肽(3管)包被一小时。洗涤Dynabeads，随后在室温下以端对端旋转封闭1小时。

[2087] 为了去除脱靶结合物,将封闭的噬菌体文库添加到封闭的脱靶加载的Dynabeads中,并在室温下以端对端旋转孵育10分钟。该去除步骤重复2次。将去除过的噬菌体文库添加到封闭的靶标加载的Dynabeads中,并在RT下端对端旋转孵育60分钟。

[2088] 严格洗涤后(3次封闭缓冲液(PBS-T,3%奶粉)和9次PBS-T(150mM NaCl;8mM Na2HPO4;1.5mM KH2PO4;调整至pH=7.4-7.6,0.05%Tween-20)),带有Fab-噬菌体特异性结合包被靶标的Dynabeads被直接用于感染大肠杆菌菌株HB101。随后使用M13KO7辅助噬菌体(Invitrogen)在大肠杆菌菌株HB101中扩增噬菌体。

[2089] 在接下来的选择轮次中,靶标浓度降低以增加高亲和力结合物的选择压力。在文库淘选期间,执行了两种不同的选择策略(图4)。该策略旨在鉴定对包含TRD的人CCR8 N端区和/或包含TRD的食蟹猴CCR8 N端区域表现出结合活性的抗体。用作抗原或用于脱靶淘选的所有肽至少在一个位置被硫酸化,参见表4.1和表6.1。

[2090] 对于这两种策略,加入使用包含TRD(TPP-14829,SEQ ID NO:22,Y22被硫酸化)作为脱靶肽的生物素化人CCR4 N端区的去除步骤。

[2091] 策略I包括对人CCR8 N端硫酸化肽(TPP-14827,SEQ ID NO:46,Y3、Y15、Y17被硫酸化)进行第一轮淘选,然后对同一肽(TPP-14827,SEQ ID NO:46,Y3、Y15、Y17被硫酸化)或在食蟹猴CCR8 N端,硫酸化肽(TPP-14828,SEQ ID NO:47,Y3、Y15、Y17被硫酸化)上进行3论淘选。

[2092] 策略II包括对食蟹猴CCR8 N端,硫酸化肽(TPP-14828,SEQ ID NO:47,Y3、Y15、Y17被硫酸化)进行第一轮淘选,然后对同一肽(TPP-14828,SEQ ID NO:47,Y3、Y15、Y17被硫酸化)或人CCR8 N端,硫酸化肽(TPP-14827,SEQ ID NO:46,Y3、Y15、Y17被硫酸化)进行3轮淘选,如图4所示。

[2093] 对于第一次定性评估,对每个克隆库进行了88个随机挑选的噬菌体上Fab(Fab-on-phage)克隆的单克隆培养和表达,随后测试了克隆与先前用于淘选的各个靶标的结合。此外,通过流式细胞术(FACS)确定与人和食蟹猴CCR8表达细胞的结合。

[2094] 特定结合物在特定上下文中被定义为分子显示

[2095] (i)在ELISA测定中,靶标的信号强度比脱靶信号强度高至少10倍,

[2096] (ii)在FACS测定中,表达CCR8的细胞系的信号比不表达CCR8的对照细胞系的信号高至少2倍,并且

[2097] (iii)在FACS测定中,对照细胞系上的信号小于10000。

[2098] 来自12个库的在两个测定的至少一个中具有显著命中率的质粒被提交进行基因III去除,并在高通量ELISA和FACS筛选中筛选得到可溶性Fab。

[2099] 实施例7:人抗人CCR8抗体的高通量筛选

[2100] 从噬菌体展示期间产生的12个克隆库中,通过ELISA(HTS-ELISA)在高通量筛选中筛选了17000个不同的sFab克隆,以确定它们与先前用于噬菌体展示淘选的肽的结合,即(i)TPP-14827,SEQ ID NO:46,Y3、Y15、Y17被硫酸化,(ii)TPP-14828,SEQ ID NO:47,Y3、Y15、Y17被硫酸化,以及(iii)相应的脱靶肽TPP-14829,SEQ ID NO:22,Y22被硫酸化。对于ELISA筛选,在4℃的涂覆缓冲液(Carbonat-Basis,Candor 121125)中以浓度0.1μg/ml将肽固定在链霉素涂覆的板(Greiner bio-one 781997)上。用60μl PBS 0.05%Tween洗涤板3次并用50μl Smart Block®(Candor 113500)在20℃下封闭1小时后,将10μl sFab样品添

加到板中并在20℃下孵育1小时。随后用60μl PBS 0.05％Tween洗涤3次后，加入20μl抗c-Myc HRP抗体，20℃孵育1h，随后用60μl PBS 0.05％Tween洗涤3次，加入20μl Amplex Red溶液(Invitrogen A12222，1:1000在NaP缓冲液50mM pH7.6中，含1:10000的30％H2O2)。在20℃下最终孵育20分钟后，使用595nm的发射波长和530nm的激发波长确定信号。为了分析，使用单个sFab克隆的信号与背景比，而背景由不包含任何sFab培养物但包含相应的样品培养基的每个板上的48个孔的平均值定义。

[2101] 总共2193个不同的sFab克隆显示与人和食蟹猴N端硫酸化肽TPP-14827(SEQ ID NO:46，Y3、Y15、Y17被硫酸化)和TPP-14828(SEQ ID NO:47，Y3、Y15、Y17被硫酸化)两者的显著结合，如大于5的信号背景比所示，同时未显示与脱靶TPP-14829(SEQ ID NO:22，Y22被硫酸化)有任何显著结合。这些sFab克隆被重新构建为全长人IgG1抗体，并应用于人和食蟹猴CCR8表达细胞系的FACS筛选。

[2102] 基于与食蟹猴和人CCR8表达细胞两者的结合，以及未显示与不表达CCR8的亲本细胞系有任何显著的非特异性结合，选择十个抗体克隆用于产生和进一步表征。这些初始命中是TPP-17575至TPP-17581和TPP-18205至TPP-18207，CDR显示在表7.1中。进一步手动优化抗体以用于治疗而产生表7.2a和表7.2b中所示的抗体组，还参见序列表。

[2103] 此外，为了获得抗体TPP-27495，TPP-23411的序列被工程化为包含YTE突变M252Y、S254T和T256E。TPP-27495是70％无岩藻糖基化的。

[2104] 此外，为了获得抗体TPP-27496，TPP-23411的序列被工程化为包含LS突变M428L和N434S。TPP-27496是70％无岩藻糖基化的。

[2105] 实施例8:抗鼠CCR8抗体的产生

[2106] 噬菌体展示和抗体筛选

[2107] 全人抗体噬菌体展示文库(BioInvent n-CoDeR Fab lambda文库)用于通过选择可溶性生物素化肽来分离识别鼠CCR8的人单克隆抗体。肽由Pepscan提供。如本文其他处所述进行肽的合成。对于淘选程序，应用以下方案。

[2108] 链霉素偶联的Dynabeads M-280(Invitrogen™)在室温(RT)下分别用生物素化肽(1管)和生物素化脱靶肽(3管)包被一小时。洗涤Dynabeads，随后在室温下以端对端旋转封闭1小时。为了去除脱靶结合物，将封闭的噬菌体文库添加到封闭的脱靶加载的Dynabeads中，并在室温下以端对端旋转孵育10分钟。该去除步骤重复2次。将去除过的噬菌体文库添加到封闭的靶标加载的Dynabeads中，并在RT下端对端旋转孵育60分钟。

[2109] 严格洗涤后(3次封闭缓冲液(PBS-T，3％奶粉)和9次PBS(150mM NaCl；8mM Na2HPO4；1.5mM KH2PO4；调整至pH＝7.4-7.6)和0.05％Tween-20))，带有Fab-噬菌体特异性结合包被靶标的Dynabeads被直接用于感染大肠杆菌菌株HB101。随后使用M13KO7辅助噬菌体(Invitrogen™)在大肠杆菌菌株HB101中扩增噬菌体。

[2110] 在接下来的选择轮次中，靶标浓度降低以增加高亲和力结合物的选择压力。

[2111]

表 7.1: 用根据本发明的方法获得的特异性人抗人 CCR8 候选抗体的 CDR。

编号	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
TPP-17575	SGSSSNIGNNYVS	GNSNRPS	QTWGTGIRV	SYAMH	LISWDGGSTYYADSVKG	GGIGRRPGLEY
TPP-17576	SGSSSNIGNNAVN	RNNQRSS	QSYDNSLSASV	SYAMS	RIRSKANSYATAYAASVKG	PLDS
TPP-17577	SGSSSNIGSNTVN	RNNQRPS	AAWDDSLKALV	NAWMS	VISYDGRNKYSADSVKG	GLPYGY
TPP-17578	SGSSSNIGSHTVN	RNNQRPS	AAWDDSLNGWV	NAWMS	GINWNGGSTGYADSVKG	TYSGHYGPYFDN
TPP-17579	SGSWSNIGNDNVY	RNNQRPS	QSYDRSLSGSV	TYWMT	GVSWNGSRTHYVDSVKR	YSGYPDYYGMDV
TPP-17580	SGSSSNIGSYPVN	RNNQRPS	SSYSVTDNLI	SYGMH	GVSWNGSRTRYADSVKG	GSYNSGWYAVS
TPP-17581	TGSSSNIGAGYDVH	SHNQRPS	SAWDSSLSAWV	NYRMT	GINWNGGSTGYADSVKG	GRFDTRGFYGFDY
TPP-18205	SGGNSNIGTYFVS	TNNQRPS	ETWDSNTRV	SYAMS	GIRWNSGSKGYAGSVKG	SGNYYVGYHGMDV
TPP-18206	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGWV	HYGMH	GINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-18207	TGSSSNIGAGYDVH	KNNQRPS	AAWDDSLRGWV	NAWMS	GINWNGGSTGYADSVKG	TYTGNYGPYFDY

表 7.2 a: 具有优异的治疗特性的根据本发明的特异性人抗人 CCR8 候选抗体的 CDR。

编号	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
TPP-16966	SGSSSNIGSHIVN	GNTNRPS	SSYTSISTLV	SYSMN	GVSWAGSRTHYADSVKG	AAAGTRGFDY
TPP-17546	SGSSSNIGSHTVN	RNNQRPS	AAWDDSLNGWV	SAWMS	GISWSGGSTGYADSVKG	TYSGHYGPYFDY
TPP-17578	SGSSSNIGSHTVN	RNNQRPS	AAWDDSLNGWV	NAWMS	GINWNGGSTGYADSVKG	TYSGHYGPYFDN
TPP-18205	SGGNSNIGTYFVS	TNNQRPS	ETWDSNTRV	SYAMS	GIRWNSGSKGYAGSVKG	SGNYYVGYHGMDV
TPP-18206	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGWV	HYGMH	GINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-19546	SGSSSNIGSHTVN	RNNQRPS	AAWDDSLNGWV	SAWMS	GISWSGGSTGYADSVKG	TYSGHYGPYFDY
TPP-20950	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGWV	SYGMH	AIKWGGGSHGYADSVKG	GHHSGKDGRFFDY
TPP-20955	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGWV	SYGMH	AIKWGGGSHGYADSVKG	GHHKGYDGRFFDY
TPP-20965	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGWV	SYGMH	AIKWGGGSTGYADSVKG	GHHSGKDGRFFDY
TPP-21045	SGSSSNIGSHTVN	RNNQRPS	AAWDDSLNGWV	SAWMS	GISWSGGSTGYALSVKG	TYSGHYGPFFDY
TPP-21047	SGSSSNIGSHTVN	RNNQRPS	AAWDDSLNGWV	SAWMS	GISWSGGRTGYALSVKG	TYSGHYGPYFDY
TPP-21181	SGGNSNIGTYFVS	TNNQRPS	ETWDSNTRV	SYAMS	GIRWNNGSKGYAGSVKG	SGNYYYGYHGMDV
TPP-21183	SGGNSNIGTYFVS	TNNQRPS	ETWDSNTRV	SYAMS	GIRWNNGSKGYAGSVKG	SGNEYYGYHGMDV
TPP-23411	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGWV	SYGMH	AINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY

[2112]

Table 7.2 b: 来自 TPP-23411 的抗人 CCR8 候选抗体的 CDR。

编号	突变	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
TPP-29596	VL: A10V, T13A; VH: H31S; C 端 K	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGW V	SYGMH	GINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-29597	VL: T13; VH: H31S, G50A; C 端 K	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGW V	SYGMH	AINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-18429	VL: A10V	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGW V	HYGMH	GINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-18430	VL: T13A	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGW V	HYGMH	GINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-18432	VL: A10V, T13A	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGW V	HYGMH	GINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-18433	VH: H31S	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGW V	SYGMH	GINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-18436	VH: G50A	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGW V	HYGMH	AINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-19571	VH: H31S, G50A	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGW V	SYGMH	AINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-27477	VL: A10V; VH: H31S, G50A	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGW V	SYGMH	AINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-27478	VL: T13A; VH: H31S, G50A	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGW V	SYGMH	AINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-27479	VL: A10V, T13A; VH: H31S	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGW V	SYGMH	GINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-27480	VL: A10V, T13A; VH: G50A	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGW V	HYGMH	AINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-29367	C 端 K	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGW V	HYGMH	GINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY
TPP-29368	VL: A10V, T13A;	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGW	HYGMH	GINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY

[2113]

	C 端 K			V			
TPP-29369	VH: H31S, G50A; C 端 K	TGSSSNIGAGYNVH	TNNRRPS	AAWDASLSGWV	SYGMH	AINWNGGSTGYADSVKG	GHHSGYDGRFFDY

表 7.3: 用混合方法获得的特异性抗鼠 CCR8 候选抗体的 CDR。

编号	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
TPP-14099	SGSSFNIGSHFVY	KNNQRPS	AAWDDSLNGPV	DYGVH	GVSWNGSRTHYADSVKG	RGA
TPP-14095	SGSSSNIGSNYVY	GNNNRPS	AAWDDSLNGWV	SYGMH	AISGSGGSTYYADSVKG	GRQLGS
TPP-15285	SGSSFNIGSHFVY	KNNQRPS	AAWDDSLNGPV	DYGVH	GVSWNGSRTHYADSVKG	RGA
TPP-15286	SGSSSNIGSNYVY	GNNNRPS	AAWDDSLNGWV	SYGMH	AISGSGGSTYYADSVKG	GRQLGS

表 8.1: 用于通过噬菌体展示和 ELISA 筛选抗体的肽的列表

ID	抗原	物种	结构域	硫酸化	另外的修饰
TPP-13792	**CCR8**	小鼠	**TRD**	无	通过 TTDS 赖氨酸接头的 N 端生物素化
TPP-13793	**CCR8**	小鼠	**TRD**	**Y3, Y14, Y15**	通过 TTDS 赖氨酸接头的 N 端生物素化
TPP-13799 (脱靶)	**CCR4**	人	**TRD**	无	通过 TTDS 赖氨酸接头的 N 端生物素化
TPP-13800	**CCR4**	人	**TRD**	**Y19, Y22**	通过 TTDS 赖氨酸接头的 N 端生物素化

表 9.1: 根据本发明的方法获得的特异人抗人 CCR8 候选蛋白的 HCDR3 的结构分析

编号	HCDR3	H	K	R	Y	D	E	% H	% K	% R	% Y	% D	% E	% (H + Y)	% 正	% 负	% 带电	长度
TPP-17575	GGIGRRPGLEY	0,0	0,0	2,0	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0	18,2	9,1	0,0	9,1	9,1	18,2	9,1	27,3	11,0
TPP-17576	PLDS	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0	25,0	25,0	4,0
TPP-17577	GLPYGY	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	0,0	0,0	33,3	0,0	0,0	0,0	6,0
TPP-17578	TYSGHYGPYFDN	1,0	0,0	0,0	3,0	1,0	0,0	8,3	0,0	0,0	25,0	8,3	0,0	33,3	8,3	8,3	16,7	12,0
TPP-17579	YSGYPDYYGMDV	0,0	0,0	0,0	4,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	16,7	0,0	33,3	0,0	16,7	16,7	12,0
TPP-17580	GSYNSGWYAVS	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	18,2	0,0	0,0	18,2	0,0	0,0	0,0	11,0
TPP-17581	GRFDTRGFYGFDY	0,0	0,0	2,0	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0	15,4	15,4	15,4	0,0	15,4	15,4	15,4	30,8	13,0
TPP-18205	SGNYYVGYHGMDV	1,0	0,0	0,0	3,0	1,0	0,0	7,7	0,0	0,0	23,1	7,7	0,0	30,8	7,7	7,7	15,4	13,0
TPP-18206	GHHSGYDGRFFDY	2,0	0,0	1,0	2,0	2,0	0,0	15,4	0,0	7,7	15,4	15,4	0,0	30,8	23,1	15,4	38,5	13,0

[2114]

TPP-18207	TYTGNYGPYFDY	0,0	0,0	0,0	4,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	8,3	0,0	33,3	0,0	8,3	8,3	12,0
平均		**0,4**	**0,0**	**0,5**	**2,3**	**1,0**	**0,1**	3,1	0,0	4,1	20,6	9,7	0,9	23,8	7,3	10,6	17,9	10,7

表 9.2:具有优异治疗特性例如低内化的特异人抗人 CCR8 候选蛋白的 HCDR3 的结构分析

编号	HCDR3	H	K	R	Y	D	E	% H	% K	% R	% Y	% D	% E	% (H+Y)	% 正	% 负	% 带电	长度
TPP-16966	AAAGTRGFDY	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	10,0	10,0	10,0	0,0	10,0	10,0	10,0	20,0	10,0
TPP-17546	TYSGHYGPYFDY	1,0	0,0	0,0	4,0	1,0	0,0	8,3	0,0	0,0	33,3	8,3	0,0	41,7	8,3	8,3	16,7	12,0
TPP-17578	TYSGHYGPYFDN	1,0	0,0	0,0	3,0	1,0	0,0	8,3	0,0	0,0	25,0	8,3	0,0	33,3	8,3	8,3	16,7	12,0
TPP-18205	SGNYYVGYHGMDV	1,0	0,0	0,0	3,0	1,0	0,0	7,7	0,0	0,0	23,1	7,7	0,0	30,8	7,7	7,7	15,4	13,0
TPP-18206	GHHSGYDGRFFDY	2,0	0,0	1,0	2,0	2,0	0,0	15,4	0,0	7,7	15,4	15,4	0,0	30,8	23,1	15,4	38,5	13,0
TPP-19546	TYSGHYGPYFDY	1,0	0,0	0,0	4,0	1,0	0,0	8,3	0,0	0,0	33,3	8,3	0,0	41,7	8,3	8,3	16,7	12,0
TPP-20950	GHHSGKDGRFFDY	2,0	1,0	1,0	1,0	2,0	0,0	15,4	7,7	7,7	7,7	15,4	0,0	23,1	30,8	15,4	46,2	13,0
TPP-20955	GHHKGYDGRFFDY	2,0	1,0	1,0	2,0	2,0	0,0	15,4	7,7	7,7	15,4	15,4	0,0	30,8	30,8	15,4	46,2	13,0
TPP-20965	GHHSGKDGRFFDY	2,0	1,0	1,0	1,0	2,0	0,0	15,4	7,7	7,7	7,7	15,4	0,0	23,1	30,8	15,4	46,2	13,0
TPP-21045	TYSGHYGPFFDY	1,0	0,0	0,0	3,0	1,0	0,0	8,3	0,0	0,0	25,0	8,3	0,0	33,3	8,3	8,3	16,7	12,0
TPP-21047	TYSGHYGPYFDY	1,0	0,0	0,0	4,0	1,0	0,0	8,3	0,0	0,0	33,3	8,3	0,0	41,7	8,3	8,3	16,7	12,0
TPP-21181	SGNYYYGYHGMDV	1,0	0,0	0,0	4,0	1,0	0,0	7,7	0,0	0,0	30,8	7,7	0,0	38,5	7,7	7,7	15,4	13,0
TPP-21183	SGNEYYGYHGMDV	1,0	0,0	0,0	3,0	1,0	1,0	7,7	0,0	0,0	23,1	7,7	7,7	30,8	7,7	15,4	23,1	13,0
TPP-23411	GHHSGYDGRFFDY	2,0	0,0	1,0	2,0	2,0	0,0	15,4	0,0	7,7	15,4	15,4	0,0	30,8	23,1	15,4	38,5	13,0
平均		**1,3**	**0,2**	**0,4**	**2,6**	**1,4**	**0,1**	10,1	1,6	3,5	21,3	10,8	0,5	31,4	15,2	11,4	26,6	12,4

[2115] 为了生成结合小鼠CCR8的抗体，设计了一种选择策略来鉴定对N端区域内的小鼠CCR8富含酪氨酸的结构域(TRD)表现出结合活性的抗体。对于小鼠CCR8 TRD肽的阳性选择，

使用含有50％正常肽和50％硫酸化肽的混合物(Seq ID NO:45非硫酸化(TPP-13792)或Y3、Y14、Y15被硫酸化(TPP-13793))。包含使用生物素化的脱靶肽N端区域内的人CCR4 TRD的去除步骤。此外,对硫酸化和非硫酸化肽的混合物(Seq ID No:19非硫酸化(TPP-13799)或Y19和Y22被硫酸化(TPP-13800))进行人CCR4的去除步骤。

[2116] 淘选策略是总共进行四轮淘选,每轮针对指定的硫酸化和非硫酸化肽混合物,见图5。

[2117] 对于每个克隆库进行了88个随机挑选的噬菌体上Fab(Fab-on-phage)克隆的单克隆培养和表达,随后测试了克隆与先前用于淘选的相应靶标的结合。然而,对硫酸化和非硫酸化肽进行了单独的ELISA测量。

[2118] 此外,通过流式细胞术(FACS)确定与表达人、小鼠和食蟹猴CCR8的细胞的结合。

[2119] 特定结合物在特定上下文中被定义为分子显示

[2120] (i)在ELISA测定中,靶标的信号强度比脱靶信号强度高至少10倍,并且

[2121] (ii)在FACS测定中,表达CCR8的细胞系的信号比不表达CCR8的对照细胞系的信号高至少10倍。

[2122] 在这些测量中,抗体TPP-14095和TPP-14099被鉴定为与小鼠CCR8表达细胞结合,但不与对照细胞、表达人CCR8的对照细胞或表达食蟹猴CCR8的对照细胞结合。此外,发现抗体与硫酸化TRD肽结合,但不与非硫酸化肽结合。

[2123] 实施例9:CCR8抗体的结构表征

[2124] 在六个CDR环中,H3环显示出最大的结构多样性并且位于结合位点的中心。它还通过亲和力成熟获得最多的突变,平均与抗原的接触次数最多。因此,它在抗原结合中起着至关重要的作用。

[2125] 通过分析前面实施例中获得的抗体的具体结构,令人惊讶地发现HCDR3的组成在结构上不同于通常的人HCDR3结构域。更详细地说,人抗人CCR8抗体的HCDR3结构域的酪氨酸残基数量明显高于对具有匹配长度的随机全人HCDR3的预期(～10％,参见Zemlin,Michael,et al."Expressed murine and human HCDR3 intervals of equal length exhibit distinct repertoires that differ in their amino acid composition and predicted range of structures."Journal of molecular biology 334.4(2003):733-749)。

[2126] 这些数据表明酪氨酸的存在对特异性结合硫酸化抗原具有有益影响。优化抗体的特征还在于组氨酸频率的显著增加。对于这些抗体,组氨酸含量平均为10％。匹配长度的HCDR3中组氨酸的平均出现率在鼠HCDR3中约为2％,在人HCDR3中甚至更低,参见Zemlin,Michael,et al.(2003)。

[2127] 因为用于选择的抗原的特征在于以硫酸化酪氨酸和带负电荷的氨基酸形式提供的负电荷,发明人假设HCDR3中正电荷的出现提高了与硫酸化抗原的结合,但对于结合非硫酸化抗原是更不必需的。虽然最初获得的抗体组的HCDR3中带正电荷的残基(H、K、R)的频率约为7％,但改进后的抗体每个HCDR3平均具有15％的带正电荷氨基酸(例如高达约31％)。

[2128] 根据本发明的抗体的特征在于酪氨酸频率高于通常的全人HCDR3。虽然这些高酪氨酸频率更容易用鼠CDR获得,但这可以解释为什么以前尝试获得特异性识别CC趋化因子受体如CCR8的人抗人抗体没有成功。

[2129] 实施例10:抗CCR8抗体的功能表征

[2130] 细胞系

[2131] 使用本领域已知的Inscreenex产生表达人、食蟹猴或小鼠CCR8的稳定HEK 293和CHO细胞系。胸腺细胞系Hut-78和淋巴瘤细胞系TALL-1从ATCC获得,并证实显示内源性CCR8表达。由于CCR8的表达可能不同,因此对表达水平进行了监测。

[2132] 人调节性T细胞

[2133] FACS分选的来自健康供体PBMC的CD4+和CD25+细胞购自BioIVT、AllCells或StemCell Technologies。在解冻细胞并在培养物中恢复过夜后,按照Treg扩增试剂盒方案的指示,用来自Miltenyi的设计用于Treg扩增的抗CD3和抗CD28珠激活细胞,并补充IL-2(R&D Systems)。通常,在激活幼稚的PBMC后,CCR8的表达在第5-7天之间最高,并且细胞可以在初次激活后7-9天重新激活。再刺激后,CCR8表达在第2-4天之间最高。

[2134] 实施例10.1.1:评估结合来自不同物种的CCR8的亲和力

[2135] FACS实验

[2136] 抗体对人、食蟹猴和鼠CCR8和其他趋化因子受体的亲和力通过本领域已知的FACS确定。简而言之,CHO细胞被工程化以表达来自各个物种的CCR8。或者,使用来自人类供体的激活的人Treg来确定抗体对激活的Treg的亲和力。EC50值由FACS确定。所有候选抗体不仅对人CCR8具有较高的亲和力,其EC50在低数纳摩尔范围内,而且对食蟹猴CCR8也具有相同数量级的较高的亲和力。这些物种中的相似亲和力对于促进研究以预测人类以后的安全问题非常重要。这是在免疫肿瘤学中寻找治疗性抗体的一个主要问题,因为小鼠模型在预测人类免疫学副作用方面有很大的局限性。对于表10.1.1.1中所示的本发明抗体,确定的结合人Treg的EC50在10和25nM之间。

[2137] 本发明抗体在表达人CCR8的CHO细胞、表达食蟹猴CCR8的CHO细胞或激活的人Tregs(供体1)中的亲和力分别显示在图6、7和8中。

[2138] 表10.1.1.1:以nM为单位的本发明抗体的EC50值。对稳定表达人CCR8或食蟹猴CCR8的CHO细胞,或对人激活的CD4+CD25+T细胞进行FACS染色。这些细胞用Miltenyi的Treg扩增试剂盒激活。

[2139]

	TPP-17578	TPP-19546	TPP-18206	TPP-21360
具有 hCCR8 的 CHO: EC50 为 nM	1.66	0.78	0.64	0.40

[2140]

具有 cynoCCR8 的 CHO: EC50 为 nM	1.04	0.52	0.67	0.34
人 Treg: EC50 为 nM	25.12	15.25	23.1	10.35

[2141] 抗体TPP-23411和TPP-21360因在重链的C端添加一个赖氨酸残基而彼此不同,即TPP-23411包含赖氨酸。TPP-23411和TPP-21360在单独的FACS实验中测试了与人和食蟹猴CCR8的结合。结合人CCR8和食蟹猴CCR8的EC50曲线在两种抗体之间完美比对(数据未显示,IC50值参见表10.1.1.2)。

[2142] 表10.1.1.2:以nM为单位测量的候选EC50值。对稳定表达人CCR8或食蟹猴CCR8的CHO细胞进行染色。

[2143]

	TPP-21360	TPP-23411
具有hCCR8的CHO:EC50以nM	1.4	1.7

具有cynoCCR8的CHO:EC50以nM	0.8	0.9

[2144] TPP-21181和TPP-23411在单独的FACS实验中测试了与人和食蟹猴CCR8的结合,参见图9、10。各自的EC50值列于表10.1.1.3。

[2145] 表10.1.1.3:以nM为单位测量的抗体EC50值。对稳定表达人CCR8或食蟹猴CCR8的CHO细胞进行染色。

[2146]

	TPP-21181	TPP-23411
具有hCCR8的CHO:EC50以nM	4.8	4.4
具有cynoCCR8的CHO:EC50以nM	1.8	1.3

[2147] 在进一步的FACS实验中,将现有技术抗体L263G8(Biolegend)和433H(ICOS,BD)与TPP-21360在与人和食蟹猴CCR8的结合方面进行比较,参见图11、12和表10.1.1.4。现有技术抗体仅显示出与食蟹猴CCR8的总体结合很低或基本上没有(低饱和度,此处MFI＜＜1000)。只有根据本发明的抗体以相同数量级的亲和力特异性识别人和食蟹猴CCR8,即在一些情况下甚至在亚纳摩尔范围内。

[2148] 表10.1.1.4:TPP-21360与L263G8和433H相比的EC50值。对稳定表达人CCR8或食蟹猴CCR8的CHO细胞进行染色。

[2149]

	TPP-21360	L263G8	433H
具有hCCR8的CHO:EC50以nM	0.58	0.31	2.8
具有cynoCCR8的CHO:EC50以nM	0.51	132	12.1

[2150] 这些结果表明,针对困难的靶标(例如CCR8),硫酸化抗原的使用促进了对其预期靶标具有特异性的交叉反应性抗体的产生,例如食蟹猴/人抗体。作为概念验证,激活的人Treg用本发明抗体TPP-23411或现有技术抗体L263G8染色,如图13所示。识别鼠CCR8的本发明抗体同样对其靶标具有极好的亲和力,如表10.1.1.5所示。

[2151] 表10.1.1.5:TPP-14095和TPP-14099的EC50值。对表达鼠CCR8的CHO细胞进行FACS染色。

[2152]

	TPP-14095	TPP-14099
EC50以nM	0.7	3

[2153] 表10.1.1.6显示了各种其他本发明的抗人CCR8抗体与用人CCR8或食蟹猴CCR8转染的CHO细胞或表达内源性人CCR8的Hut78细胞结合的EC50值。有趣的是,具有G50A突变的抗体对表达食蟹猴CCR8的CHO细胞具有更高的结合亲和力。因此优选包含该构架突变的抗CCR8抗体。

[2154] 表10.1.1.6表征本发明的抗人CCR8抗体与转染人CCR8或食蟹猴CCR8的CHO细胞(如本文别处所述)或与内源性表达人CCR8的细胞系HuT78的结合的以M表示的EC50值。

[2155]

抗体	hCCR8:CHO EC50 [M]	cynoCCR8:CHO EC50 [M]	HuT78 EC50 [M]
TPP-17577	1.11E-08	9.81E-09	
TPP-17578	1.15E-08	2.72E-09	1.78E-07
TPP-18205	8.33E-09	8.59E-08	1.41E-07
TPP-18206	2.63E-09	2.23E-09	4.70E-08
TPP-20955	4.69E-10	4.75E-10	4.56E-10
TPP-21047	2.56E-09	3.77E-10	5.02E-09
TPP-23411	1.38E-09	7.76E-10	2.78E-09
TPP-27495	1.32E-09	5.35E-10	3.25E-09
TPP-27496	1.51E-09	4.55E-10	3.68E-09
TPP-18429	1.48E-09	2.25E-09	2.93E-08

[2156]

TPP-18430	1.69E-09	1.37E-09	5.24E-08
TPP-18432	2.21E-09	3.33E-09	1.91E-08
TPP-18433	1.48E-09	1.92E-09	3.30E-08
TPP-18436	1.12E-09	4.42E-10	3.76E-09
TPP-19571	1.48E-09	8.79E-10	1.49E-09
TPP-27478	2.74E-09	1.02E-09	
TPP-27477	1.01E-09	4.18E-10	2.10E-09
TPP-27479	2.22E-09	5.88E-09	1.31E-08
TPP-27480	1.14E-09	7.70E-10	4.71E-09

[2157] 实施例10.1.2:用于表征抗体对不同物种的未修饰TRD结构域的结合亲和力的SPR实验

[2158] 为了分析抗体对其未修饰(即非硫酸化)抗原的亲和力,表面等离子共振(SPR)结合测定在Biacore T200仪器上在25℃下使用测定缓冲液HBS-EP+1x、1mg/ml BSA、300mM NaCl进行。使用与CM5传感器芯片共价胺偶联的抗人Fc IgG捕获IgG。N端His6标记的人CCR8 TRD(TPP-19950:MDYTLDLSVTTVTDYYYPDIFSSP,SEQ ID NO:43)、食蟹猴CCR8 TRD(TPP-19952:MDYTLDPSMTTMTDYYYPDSLSSP,SEQ ID NO:44)或鼠CCR8 TRD(TPP-19951:MDYTMEPNVTMTDYYPDFFTAP,SEQ ID NO:45)在C端与人血清白蛋白(HSA)融合以生成CCR8-HSA融合蛋白。各自的CCR8-HSA融合蛋白在多循环动力学模式中用作浓度范围为1.56-200nM的分析物。获得的传感图适用于1:1朗缪尔结合模型。对于人抗人CCR8抗体TPP-23411和TPP-21360,结合很低(160nM)并且与食蟹猴CCR8 TRD的结合甚至更低,例如在μM范围内,这些支持硫酸化对于本发明抗体的抗体识别的重要性。

[2159] 表10.1.2.1:通过SPR测定的本发明抗体对人、食蟹猴或鼠CCR8的His6标记的HSA融合TRD的结合亲和力。与食蟹猴CCR8肽的结合在μM范围内,并且是一个近似值,因为测试的最高浓度为200nM。单独的HSA和同种型对照未显示任何结合(数据未显示)。

[2160]

配体	**分析物**	**k_a [1/Ms]**	**k_d [1/s]**	**K_D [M]**

[2161]

TPP-21360	cyno	*3.5E+04*	*1.3E-01*	*3.8E-06*
	人	**1.2E+05**	**1.8E-02**	**1.6E-07**
	小鼠	无结合		
TPP-14099	cyno	无结合		
	人	无结合		
	小鼠	**2.2E+03**	**1.1E-03**	**5.2E-07**
TPP-23411	cyno	*6.2E+03*	*1.2E-01*	*2.0E-05*
	人	**1.1E+05**	**1.7E-02**	**1.6E-07**
	小鼠	无结合		

[2162] 实施例10.1.3:用于结合亲和力的系统表征的SPR实验

[2163] 进行SPR结合测定以系统地评估抗体与a)非硫酸化v.硫酸化抗原、b)TRD v.N端和c)人v.食蟹猴CCR8的结合。SPR结合测定是在Biacore T200仪器(Cytiva)上于25℃下使用测定缓冲液1x HBS-EP+(订单号BR100826,Cytiva)进行的。肽用作配体,并使用其C端生物素标记捕获到链霉素蛋白包被的传感器芯片上(“Sensor Chip SA”,订单号BR100398,Cytiva)。为此,在每个肽的C端添加末端赖氨酸(K)以进行生物素化。对于CCR8的N端,TRD和LID结构域之间天然存在的半胱氨酸被丝氨酸取代。抗体用作分析物(TPP-19546、TPP-21181、TPP-23411、hIgG1同种型对照TPP-9809和mIgG2a同种型对照TPP-10748)。测定缓冲液中分析物的浓度为0.05-10nM,测量在多循环动力学模式下进行。传感器表面在每个循环后用甘氨酸pH 2.0再生。获得的传感图是双重参考的(减去参考流动池信号和缓冲液注入),并适用于1:1 Langmuir结合模型,以使用Biacore T200评估软件导出动力学数据。

[2164] 表10.1.3.1:用于表征抗体表位的肽列表。包含CCR8的TRD序列(#1至4)或N端(#5至8)的肽,源自食蟹猴(#1、2、5、6)或人(#3、4、7、8)CCR8,硫酸化(#2、4、6、8)或非硫酸化(#1、3、5、7)。SO3:硫酸盐残基。Biot:用于固定的生物素修饰。

[2165]

#	类型	肽序列
1	Cyno_TRD	H-CMD**Y**TLDPSMTTMTD**YYY**PDSLSSPK(Biot)-OH
2	Cyno_TRD_Ys	H-CMD**Y(SO3)**TLDPSMTTMTD**Y(SO3)YY(SO3)**PDSLSSPK(Biot)-OH
3	HUMAN_TRD	H-CMD**Y**TLDLSVTTVTD**YYY**PDIFSSPK(Biot)-OH
4	HUMAN_TRD_Ys	H-CMD**Y(SO3)**TLDLSVTTVTD**Y(SO3)YY(SO3)**PDIFSSPK(Biot)-OH
5	Cyno_N 端	H-CMD**Y**TLDPSMTTMTD**YYY**PDSLSSPSDGELIQRNDKK(Biot)-OH
6	Cyno_N 端_Ys	H-CMD**Y(SO3)**TLDPSMTTMTD**Y(SO3)YY(SO3)**PDSLSSPSDGELIQRNDKK(Biot)-OH
7	HUMAN_N 端	H-CMD**Y**TLDLSVTTVTD**YYY**PDIFSSPSDAELIQTNGKK(Biot)-OH
8	HUMAN_N 端_Ys	H-CMD**Y(SO3)**TLDLSVTTVTD**Y(SO3)YY(SO3)**PDIFSSPSDAELIQTNGKK(Biot)-OH

[2166]

[2167] 对于分析的本发明抗体TPP-19546、TPP-21181和TPP-23411,未检测到与CCR8的非硫酸化TRD或非硫酸化N端的结合,不依赖于物种。相比之下,硫酸化TRD和硫酸化N-term,如

食蟹猴和/或人CCR8，测定的K_D值在pM范围的优异亲和力。在某些情况下，结合人CCR8 TRD和N端的K_D值基本相同，即在误差范围内。在其他情况下，与N端的结合略有改进。

[2168] 总之，这些结果表明硫酸化酪氨酸是结合的原因。他们进一步表明，硫酸化TRD对于结合是必要且充分的，但完整的N端的存在作为表位在某些情况下可能会进一步改善结合。最后，这些结果还证明了人和食蟹猴CCR8的交叉反应性。

[2169] 表10.1.2.3：发明抗体对食蟹猴或人CCR8的TRD或N端的SPR结合亲和力。奇数肽以未修饰的酪氨酸为特征，偶数肽以硫酸化酪氨酸(Ys)为特征。同种型对照未显示与任何肽的结合(数据未显示)。1)mp＝多相：近似值。

[2170]

肽	#	抗体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	R_{Max} (RU)	配体水平(RU)	活性%	1)
Cyno_TRD	1	IgG01_TPP-19546		无结合			12		
Cyno_TRD_Ys	2		4.92E+06	8.44E-04	1.71E-10	46	12.4	81.8	mp
人_TRD	3			无结合			17		
人_TRD_Ys	4		6.69E+06	1.62E-03	2.42E-10	36	14.5	54.8	mp
Cyno_N端	5			无结合			27		
Cyno_N端_Ys	6		1.67E+07	1.54E-03	9.22E-11	58	12	106.9	mp
人_N端	7			无结合			14		
人_N端_Ys	8		2.61E+07	4.19E-03	1.60E-10	24	21	25.2	mp

[2171]

Cyno_TRD	1	IgG02_TPP-21181		无结合			12		
Cyno_TRD_Ys	2		4.23E+09	5.87E+00	1.39E-09	30	12.4	52.9	mp
人_TRD	3			无结合			17		
人_TRD_Ys	4		5.56E+09	1.60E+01	2.87E-09	16	14.5	23.8	mp
Cyno_N端	5			无结合			27		
Cyno_N端_Ys	6		1.23E+10	1.07E+01	8.68E-10	43	12	78.5	mp
人_N端	7			无结合			14		
人_N端_Ys	8		7.69E+06	2.22E-02	2.88E-09	16	21	17.0	mp
Cyno_TRD	1	IgG03_TPP-23411		无结合			12		
Cyno_TRD_Ys	2		4.38E+06	4.54E-04	1.04E-10	46	12.4	82.1	mp
人_TRD	3			无结合			17		
人_TRD_Ys	4		2.86E+06	4.40E-04	1.54E-10	47	14.5	71.0	mp
Cyno_N端	5			无结合			27		
Cyno_N端_Ys	6		8.21E+06	4.64E-04	5.65E-11	62	12	112.9	mp
人_N端	7			无结合			14		
人_N端_Ys	8		9.19E+06	8.05E-04	8.76E-11	32	21	33.6	mp

[2172] 实施例10.2：结合的特异性

[2173] 如本文别处所述进行FACS分析以确定与靶向阴性人细胞系的非特异性结合。对于具有模拟转染子的CHO细胞，未观察到抗人CCR8抗体TPP-23160的非特异性结合(图14)。

[2174] 此外，用人CCR1或人CCR4瞬时转染HEK细胞。大多数本发明抗体的脱靶结合较低(图15、16)。

[2175] 使用来自不同肿瘤组织的细胞系的细胞组来表征这些组织中的非特异性结合(表10.2.1)。大多数抗体的总体概况是有利的，而某些抗体可以观察到一定程度的多反应性。总的来说，多反应性的程度在所有发明抗体的治疗应用的可接受范围内。然而，TPP-20950、TPP-18206、TPP-18429、TPP-18430和TPP-18433显示出更高程度的多反应性，并且在下面显示的七个细胞系中的至少两个或三个中显示出一定程度的结合。

[2176] 表10.2.1:细胞组中本发明抗体的多反应性。如果适用,EC50以M显示。

[2177]

	肝	肝	肾	肾	肺	结肠	伯基特淋巴瘤
抗体	HepG2	SKHep1	786-O	A498	H292	HT29	Raji
TPP-19546	无	无	无	无	无	无	
TPP-20950	**无**	**无**	**无**	**8,35E-07**	**7,59E-07**	**无**	
TPP-20955	无	无	无	无	无	无	
TPP-21045	1,48E-07	无	无	无	无	无	
TPP-21360	无	无	无	无	无	无	
TPP-5657 (同种型)	无	无	无	无	无	无	
TPP-17577	无	无	无	无	无	无	无
TPP-17578	无	无	无	无	无	无	无
TPP-18205	无	无	无	无	结合	无	无
TPP-18206	**结合**	**结合**	**结合**	**无**	**无**	**无**	**无**
TPP-20955	无	无	无	无	无	无	无
TPP-21047	无	无	无	无	无	无	无
TPP-23411	无	无	无	无	无	无	无
TPP-27478	无	无	无	无	无	无	无
TPP-27479	无	无	无	无	无	无	无
TPP-27480	无	无	无	无	无	无	无
TPP-27477	无	无	无	无	无	无	无
TPP-27477	无	无	无	无	无	无	无
TPP-27460	无	无	无	无	无	无	无
TPP-27461	无	无	无	无	无	无	无
TPP-27496	无	无	无	无	无	无	无
TPP-27495	无	无	无	无	无	无	无
TPP-18429	**结合**	**结合**	**结合**	**无**	**无**	**无**	**无**
TPP-18430	**结合**	**结合**	**无**	**无**	**无**	**无**	**无**
TPP-18432	无	无	无	无	无	无	无
TPP-18433	**结合**	**结合**	**无**	**无**	**无**	**无**	**无**
TPP-18436	无	无	无	无	无	无	无
TPP-23411 (afuco)	无	无	无	无	无	无	无

[2178]

[2179] 进行第一个基于ELISA的实验以分析抗体TPP-18206、TPP-17578、TPP-19546和TPP-23411以及两种参考抗体与BVP、胰岛素或DNA的非特异性结合。本发明抗体与胰岛素、DNA和/或BVP的非特异性结合低于第一参考抗体(Gantenerumab,Roche)与这些抗原的非特异性结合,也低于第二参考抗体(Remicade,Janssen Biotech)与这些抗原的非特异性结合。在测试的本发明抗体中,TPP-23411显示出对DNA、BVP和胰岛素中的每一种的最低多反应性。

[2180] 进行第二个基于ELISA的实验以分析抗体TPP-18206(wt或afuco)、TPP-21360 afuco、TPP-23411(wt或afuco)、TPP-20955、TPP-21047、和参考TPP-9809(同种型对照)、Gantenerumab(TPP-12151)、Lenzilumab(TPP-12166)、Remicade(TPP-12160)和Avastin(TPP-17586)。测试的本发明抗体与胰岛素、DNA以及BVP的非特异性结合低于第一参考抗体(Gantenerumab,Roche)的非特异性结合。TPP-20955和TPP-21047显示总体上比其他发明抗体更多的非特异性结合(数据未显示)。总的来说,多反应性程度在所有发明抗体的治疗应用的可接受范围内,不依赖于其非岩藻糖基化状态。

[2181] 进行第三个基于ELISA的实验以分析抗体TPP-27495(YTE)、TPP-27496(LS)、TPP-18429、TPP-18430、TPP-18432、TPP-18433、TPP-18436、TPP-27479、TPP-27480和对照抗体与BVP、胰岛素或DNA的非特异性结合。总的来说,多反应性程度在所有发明抗体的治疗应用的可接受范围内,不依赖于YTE或LS突变。

[2182] 通过对这些细胞群进行染色来分析本发明的CCR8抗体与不同于人Treg的免疫细胞群的不期望的结合,参见图17。

[2183] 图18显示CCR8在激活后Treg上的上调。

[2184] 实施例10.3:ADCC和ADCP诱导的评估

[2185] 实施例10.3.1:抗体的无岩藻糖基化

[2186] 根据本发明的抗体是使用GlymaxX技术进行糖工程化,参见US8642292,以改善抗体FC区与效应细胞表达的FC受体之间的相互作用。简而言之,该技术基于细菌酶GDP-6-脱氧-D-lyxo-4-己酮糖还原酶的异源细胞溶质共表达,该酶将岩藻糖从头合成途径重新导向为糖核苷酸GDP-鼠李糖,而后者不能被由真核细胞代谢。这会耗竭岩藻糖库并导致在N-聚糖的核心部分(无核心岩藻糖)和可变部分(无触角岩藻糖)上产生非岩藻糖基化抗体。它还抑制O-聚糖的岩藻糖基化和蛋白质-O-岩藻糖基化。从N297上的N-聚糖去除岩藻糖导致对FcγR的亲和力增加,如实施例10.3.2所示。

[2187] 实施例10.3.2:基于SPR的人Fcγ受体结合分析

[2188] 为确定本发明的抗体及其非岩藻糖基化形式结合在参与ADCC或ADCP的人效应细胞上表达的相应FC受体的能力,SPR结合测定在T200仪器上于25℃用CM5传感器芯片和测定缓冲液HBS-EP+500mM NaCl进行。FcγR变体通过胺偶联的抗His捕获抗体(ab)捕获,IgG用作浓度高达25μM的分析物。KD值来源于稳态亲和力分析或符合1:1 Langmuir等温线的动力学数据。抗体的非岩藻糖基化形式显示出与人和食蟹猴FcgRIIIa两者的结合增加,表明在两个物种中其非岩藻糖化形式的本发明抗体的ADCC诱导得到改善,因此造成Treg耗竭(表10.3.2.1)。

[2189] 此外,对食蟹猴和人FcyRIII两者具有可比的亲和力对于在食蟹猴动物模型中模拟ADCC功效很重要。这些模型系统在肿瘤免疫学中特别重要,因为啮齿动物模型通常不适合反映治疗性抗体的免疫副作用。本发明的非岩藻糖基化抗体显示出对食蟹猴和人中各自的FC受体具有高度可比性的亲和力。

[2190] 表10.3.2.1:本发明抗体对不同FC受体的亲和力的SPR分析。斜体:最高浓度为25μM且未达到饱和时的近似值;n.e.:不可评估;n.b.:无结合;res.bdg.:残留结合,不可定量评估;KD>25μM:拟合值超出饱和度。curve.TPP-9809:同种型对照。

[2191]

KD [M]	工程化	人 Fc gamma RI/CD64	人 Fc gamma RIIA/ CD32a (R167)	人 Fc gamma RIIB/ CD16b	人 Fc gamma RIIB/C (CD32b/c)	人 Fc gamma RIIIA / CD16a (V176)	人 Fc gamma RIIIA / CD16a (F176) (Acro)	Cyno Fc gamma RIII/CD16	Cyno Fc gamma RIIA/CD32 a	Cyno Fc gamma RIIB/CD32b
TPP-19546	Afuco	1,10E-08	*2,20E-05*	4,30E-06	n.b.	3,40E-07	4,20E-07	1,40E-07	KD > 25 μM	KD > 25 μM
TPP-19546		1,80E-07	n.b.	n.b.	n.b.	4,80E-06	KD > 10 μM	3,10E-06	n.b.	n.b.
TPP-20950	Afuco	1,10E-07	*1,70E-05*	4,60E-06	KD > 25 μM	2,80E-07	3,70E-07	1,70E-07	KD > 25 μM	KD > 25 μM
TPP-20950		1,80E-07	n.b.	n.b.	n.b.	7,60E-06	KD > 20 μM	5,80E-06	n.b.	n.b.
TPP-20955	Afuco	1,40E-07	6,20E-06	3,10E-06	*9,80E-06*	3,40E-07	4,20E-07	1,80E-07	KD > 25 μM	KD > 25 μM
TPP-20955		2,80E-07	n.b.	n.b.	n.b.	8,90E-06	KD > 25 μM	5,60E-06	n.b.	n.b.
TPP-20965	Afuco	1,10E-07	*1,60E-05*	4,60E-06	n.b.	4,30E-07	5,20E-07	1,90E-07	KD > 25 μM	KD > 25 μM
TPP-20965		2,00E-07	KD > 25 μM	n.b.	n.b.	3,10E-06	*7,60E-06*	*2,30E-05*	n.b.	n.b.
TPP-21045	Afuco	7,95E-09	*1,06E-05*	3,31E-06	n.b.	2,88E-07	3,16E-07	1,17E-07	KD > 25 μM	KD > 25 μM
TPP-21045		7,62E-08	KD > 25 μM	n.b.	n.b.	3,84E-06	KD > 25 μM	2,23E-06	n.b.	n.b.
TPP-21047	Afuco	7,73E-08	9,00E-06	2,97E-06	KD > 25 μM	2,44E-07	2,68E-07	9,39E-08	KD > 25 μM	KD > 25 μM
TPP-21047		7,26E-08	*1,51E-05*	n.b.	KD > 25 μM	2,79E-06	*1,01E-05*	1,46E-06	KD > 25 μM	KD > 25 μM
TPP-21360	Afuco	1,32E-07	*1,22E-05*	4,63E-06	KD > 25 μM	4,01E-07	4,78E-07	1,74E-07	KD > 25 μM	KD > 25 μM
TPP-21360		2,72E-07	n.b.	n.b.	n.b.	5,76E-06	KD > 25 μM	3,39E-06	n.b.	n.b.
TPP-9809	Afuco	1,32E-07	*1,29E-05*	5,03E-06	KD > 25 μM	4,59E-07	5,68E-07	2,13E-07	KD > 25 μM	KD > 25 μM
TPP-9809		1,69E-07	*1,74E-05*	KD > 25 μM	KD > 25 μM	5,43E-06	1,38E-05	4,28E-06	KD > 25 μM	*KD > 25 μM*
TPP-9809	野生型	2,30E-07	*1,77E-05*	*1,96E-05*	KD > 25 μM	5,57E-06	*1,32E-05*	2,26E-06	KD > 25 μM	*1,84E-05*

[2192] 实施例10.3.3:CCR8抗体介导的ADCC诱导

[2193] 实施例10.3.3.1:抗人CCR8抗体介导的ADCC诱导

[2194] 对于功能性ADCC测定，表达人CCR8的HEK细胞或激活的人Treg用作靶细胞，NK92v-GPF-CD16 176V(NantKwest)用作效应细胞。在96孔组织培养处理板中，将表达CCR8的各靶细胞与效应细胞以4:1的比率在存在各种浓度的治疗性抗体的情况下在含有1％热灭活FBS、100U/ml Pen/Strep、1mN丙酮酸钠和1x NEAA的RPMI 1640中孵育。洋地黄皂苷用于最大裂解，并在2小时孵育结束时将CytoTox-Glo(Promega)添加到测定中。使用CytoTox-glo Promega程序确定原始发光值。平均最大背景，MMB＝(靶标最大)-(靶标自发)用于计算％裂解。％Lysis＝(原始发光-no ab)/MMB X 100。

[2195] 对于候选抗体TPP-19546(上小图)和TPP-21360(下小图)，在表达人CCR8的HEK细胞中，无岩藻糖基化将ADCC诱导的细胞毒性分别增加至～50％和～70％(参见图19)。在具有约85％CCR8表达的激活的人Treg上，由无岩藻糖基化TPP-21360或TPP-23411产生的ADCC衍生细胞毒性高达59％或52％(参见图20，表10.3.3.1.3)。对于无岩藻糖基化的TPP-21360，使用NK92v作为效应细胞，具有85％CCR8表达的激活的人Tregs的细胞毒性％的平均EC50约为～20pM。表10.3.3.1.1至10.3.3.1.6显示了不同发明抗体和/或不同供体的结果。

[2196] 表10.3.3.1.1:ADCC测定总结:使用激活的Tregs作为靶细胞和NK92v细胞系作为效应细胞的EC50和最大应答。

[2197]

ADCC 效力					
抗体	**同种型**	**供体 1730**		**供体 1213**	
		EC_{50} (nM)	最大应答 (%)	EC_{50} (nM)	最大应答 (%)
TPP-17577	WT	5.76E+11	13	~7.98e+014	10
	Afuco	4.57	40	1.85	41
TPP-18342	WT	1.50	15	0.37	25
	Afuco	0.28	40	0.295	62
TPP-17578	WT	1.97E+05	8		5

[2198]

	Afuco	19.0	38	9.2	25
TPP-18205	WT	~1.8e-2	24	~5.58e-3	20
	Afuco	1.05	58	0.23	52
TPP-18206	WT	4.68	12	8.59E+15	4
	Afuco	1.68	51	0.23	47
TPP-9809	Afuco		6		4
Mogamulizumab		1.09	65	0.31	58

[2199] 表10.3.3.1.2:ADCC测定总结:使用激活的Tregs作为靶细胞和NK92v细胞系作为效应细胞的EC50和最大应答。该测定中使用的所有TPP均无岩藻糖基化。

[2200]

ADCC 效力 (供体 1100)							
	TPP-19546	**TPP-21360**	**TPP-20945**	**TPP-20950**	**TPP-20955**	**Iso afuco**	**Moga**
hTreg EC_{50} (pM)	8840	4.41	3.2	9.51	5.82	NA	35.2
最大应答 (%)	54	98	96	97	91	36	96
R^2	0.75	0.80	0.61	0.89	0.50	NA	0.94

[2201] 表10.3.3.1.3:ADCC测定总结:使用激活的Tregs作为靶细胞和NK92v细胞系作为

效应细胞的EC50和最大应答。本研究中使用的激活的人Treg具有约85％的CCR8表达。

[2202]

ADCC 效力 (供体 1100)							
	TPP-21360		TPP-23411		TPP-9809		Moga
	WT	Afuco	WT	Afuco	WT	Afuco	
hTreg EC_{50} (pM)	271	18.5	10763	22.1	NA	NA	193.4
最大应答 (%)	26	59	27	52	8	8	74
R2	0.97	0.98	0.61	0.96	NA	NA	0.89

[2203] 表10.3.3.1.4:ADCC测定总结:使用Tregs作为靶细胞和NK92v细胞系作为效应细胞EC50和最大应答。本研究中使用的激活的人Treg只有约31％的CCR8表达。

[2204]

ADCC 效力 (供体 1261)							
	TPP-21360		TPP-23411		TPP-9809		Moga
	WT	Afuco	WT	Afuco	WT	Afuco	
hTreg EC_{50} (pM)	81.3	65.6	~157	55.9	NA	NA	86.4
最大应答 (%)	13	25	8	24	2	3	71
R^2	0.27	0.90	0.30	0.64	NA	NA	0.97

[2205]

[2206] 表10.3.3.1.5:ADCC测定:使用表达人CCR8(>95％CCR8)的HEK细胞作为靶细胞和NK92v细胞系作为效应细胞的EC50和最大应答。

[2207]

ADCC 效力: HEK-hCCR8 + NK92v				
无岩藻糖基化	TPP-27479	TPP-27478	TPP-23411	TPP-9809
EC50 (pM)	363	110	141	N/A
最大应答 (%)	32	35	35	17
R^2	0.94	0.82	0.85	N/A
ADCC 效力: HEK-hCCR8 + NK92v				
无岩藻糖基化	TPP-29369	TPP-29367	TPP-23411	TPP-9809
EC50 (pM)	26.3	137	68.7	N/A
最大应答 (%)	38	22	34	7
R^2	0.65	0.36	0.71	N/A

[2208] 表10.3.3.1.6:ADCC测定:使用表达人CCR8(>95％CCR8)的HEK细胞作为靶细胞和NK92v细胞系作为效应细胞的EC50和最大应答。

[2209]

ADCC 效力: HEK-hCCR8 + NK92v					
无岩藻糖基化	TPP-29369	TPP-29367	TPP-23411	TPP-29368	TPP-9809
EC50 (pM)	99	460	167	2892	N/A
最大应答(%)	36	31	41	25	20
R^2	0,91	0,83	0,89	0,72	N/A
ADCC 效力: HEK-hCCR8 + NK92v					
n=2	TPP-27479	TPP-27478	TPP-23411	TPP-29368	TPP-9809
EC50 (pM)	823	11	182	2292	N/A
最大应答(%)	25	32	25	26	8
R^2	0,67	0,57	0,66	0,36	N/A

[2210] 实施例10.3.3.2:抗小鼠CCR8抗体(替代抗体)介导的ADCC诱导

[2211] 为了比较本发明的人抗人/食蟹猴CCR8抗体与本发明的人抗鼠CCR8替代抗体的行为,后者同样表征了ADCC诱导。使用原代鼠NK细胞作为效应细胞,使用鼠CCR8表达HEK293细胞和BW5417.3(数据未显示)作为靶细胞进行替代抗体的功能性ADCC测定。在共培养期间使用含有超低IgG的培养基以避免CCR8抗体与血清IgG的非特异性结合。此外,为了更准确地反映体内情况,在添加效应细胞之前首先将靶细胞与替代CCR8抗体预孵育,从而使FcγRIII更好地聚集在效应细胞上,这是ADCC作用模式的早期步骤。使用U型底96孔板,在含有1%Ultra-low IgG FBS One Shot培养基的RPMI 1640中以10:1的比率将效应细胞和靶细胞共培养20小时。替代抗鼠CCR8抗体TPP-15285和同种型对照抗体TPP-10748用于各种浓缩步骤。使用CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay(Promega)确定细胞毒性(细胞毒性%=[(实验值-不含抗体的对照/(靶细胞的最大裂解-靶细胞的自发裂解)]x100%)。实验值通过在添加替代CCR8抗体后将靶细胞与效应细胞共培养来确定对照值。通过在不添加本发明抗体的情况下将靶细胞与效应细胞共培养来测定对照值。对于已经在测定开始加入洋地黄皂苷的情况下,确定靶细胞的最大裂解值。通过测量测定培养基中靶细胞的自发裂解而不加入任何其他试剂来确定自发裂解值。92%至97%的靶细胞显示出鼠CCR8的表达(通过FACS确定)。TPP-15285的ADCC相关细胞毒性约为39%,平均EC50约为111pM(表10.3.3.2.1)。本发明的最高抗体浓度导致钩(hook)效应,进一步支持提议的基于ADCC的作用模式。优化的功能性ADCC测定因此证实ADCC是本发明替代CCR8抗体体内功效的相关作用模式,并因此证实抗鼠CCR8抗体TPP-15285适合作为抗人CCR8抗体的替代抗体.

[2212] 表10.3.3.2.1:使用岩藻糖基化(野生型)替代CCR8抗体的ADCC测定总结。

[2213]

ADCC 效力 (野生型)		
	TPP-15285	**TPP-10748**
EC_{50} (pM)	111	NA
最大应答 (%)	39	7
R^2	0.89	NA

[2214] 表10.3.3.2.2:ADCC测定显示由野生型替代CCR8抗体TPP-15285诱导的细胞毒性百分比(4次重复)。

[2215]

ng/ml	TPP-15285				TPP-10748			
10000	15.02	36.48	33.42	20.33	-1.62	5.23	6.95	-8.48
1000	15.04	38.89	39.03	35.56	-0.77	-2.64	3.93	-0.76
100	22.44	29.84	28.11	43.39	3.27	3.99	-0.64	-1.41
10	-2.14	8.68	3.88	35.69	11.76	-1.64	-7.4	1.79
1	-8.82	-7.13	5.02	11.33	5.46	-3.06	-5.7	-0.72
0,1	-8.4	-2.87	5.78	9.85	10.44	-8.69	4.64	-0.8
0,01	-12.68	-2.77	10.75		3.8	1	5.51	

[2216] 实施例10.3.4:抗CCR8抗体介导的ADCP诱导

[2217] 实施例10.3.4.1:抗人CCR8抗体介导的ADCP诱导

[2218] 为了产生巨噬细胞(M2c)效应细胞,从健康供体(AllCells)的PBMC中阴性选择(Miltenyi)CD14+细胞。根据StemCell Tech提供的八天分化方案进行M2c巨噬细胞分化(参

见图21)。在测定日,使用FACS对M2c进行染色以了解CD16、CD32、CD64、CD163、CD206、CD11b、CD80和CD14的表达。靶细胞是表达人CCR8的HEK细胞或激活的人Treg细胞。简而言之,根据制造商的说明,用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)(ThermoFisher)标记靶细胞。靶细胞在96孔板中与不同浓度的抗体和效应细胞以4:1的靶细胞对效应细胞比率进行共培养孵育。在这些测定中,添加了1μg/ml的抗CD47(阳性对照);这会增强应答,因为它会阻止"不要吃我"信号。孵育3-4小时后,样品在MACSQuant或Attune流式细胞仪上运行。吞噬作用%由CD206+CFSE+双阳性细胞测定。CD206是在巨噬细胞上表达的标志物。

[2219] M1巨噬细胞类似地从相同的来源材料(新鲜的PBMC)中产生。简而言之,通过阴性选择分离CD14+细胞,并在含有50ng/mL M-CSF的无血清培养基(StemCell Tech Immnocult)中培养四天。然而,在第5天,M1巨噬细胞通过添加10ng/mL LPS+50ng/mL IFN-g进行极化,而M2c巨噬细胞通过添加10ng/mL IL-10进行极化。

[2220] 图22显示了表达人CCR8的HEK细胞作为靶细胞,体外分化的巨噬细胞M2c作为效应细胞诱导吞噬作用。本发明抗体TPP-19546、TPP-21360和TPP-23411的野生型和无岩藻糖基化形式两者均诱导ADCP。图23和24以及表10.3.4.1.1至10.3.4.1.7显示了以EC50和对多种本发明抗体、多种供体和不同巨噬细胞群的最大应答为特征的ADCP诱导。对于所有抗体,观察到相当程度的ADCP。

[2221] 表10.3.4.1.1:ADCP测定总结:使用激活的Tregs作为靶细胞和M2c巨噬细胞作为效应细胞的EC50和最大应答。该测定中使用的所有TPP均无岩藻糖基化。TPP-9809是同种型对照。对于人Treg供体1212 CCR8由40%的细胞表达。

[2222]

ADCP 效力 (hTreg Donor 1212 + M2c Donor)						
	TPP-19546	TPP-21045	TPP-21360	TPP-20950	TPP-20955	TPP-9809
EC50 (pM)	NA	1220	577	128	408	NA
最大应答(%)	20	30	39	32	29	15
R^2	NA	0.49	0.88	0.71	0.83	NA

[2223] 表10.3.4.1.2:ADCP测定总结:使用激活的Tregs作为靶细胞和M2c巨噬细胞作为效应细胞的EC50和最大应答。TPP-9809是同种型对照。对于人类Treg供体1163 CCR8由67%的细胞表达。

[2224]

ADCP 效力 (hTreg Donor 1163 + M2c Donor 1)								
	TPP-19546		TPP-21045		TPP-21360	TPP-20965	TPP-9809	
	WT	Afuco	WT	Afuco	Afuco	Afuco	WT	Afuco
EC50 (pM)	NA	NA	130	30.1	205	766	NA	NA
最大应答(%)	14	15	27	28	39	44	11	10
R^2	NA	NA	0.95	0.88	0.96	1.0	NA	NA

[2225] 表10.3.4.1.3:ADCP测定总结:使用激活的Tregs作为靶细胞和M2c巨噬细胞作为效应细胞的EC50和最大应答。TPP-9809是同种型对照。对于人类Treg供体1163 CCR8由67%的细胞表达。

[2226]

ADCP 效力 (hTreg 供体 1163 + M2c 供体 2)								
	TPP-19546		TPP-21045		TPP-21360	TPP-20965	TPP-9809	
	WT	Afuco	WT	Afuco	Afuco	Afuco	WT	Afuco
EC50 (pM)	~1.688e+007	404.4	162	52.9	105	300	NA	NA
最大应答 (%)	18	18	27	28	37	36	11	14
R^2	0.94	0.87	0.98	0.95	0.97	0.98	NA	NA

[2227] 表10.3.4.1.4:ADCP测定总结:使用激活的Tregs作为靶细胞和M2c巨噬细胞作为效应细胞的EC50和最大应答。TPP-9809是同种型对照。对于人Treg供体1212 CCR8由40%的细胞表达。

[2228]

ADCP 效力 (人 Treg 供体 1212 + M2c 供体 3)						
无岩藻糖基化	TPP-20965	TPP-21360	TPP-21045	TPP-20950	TPP-20955	TPP-9809
EC50 (pM)	163	51	9.2	23	14	NA
最大应答 (%)	14	14	13	14	13	7
R^2	0.99	0.96	0.79	0.93	0.96	NA

[2229] 表10.3.4.1.5:ADCP测定总结:使用激活的Tregs作为靶细胞和M2c巨噬细胞作为效应细胞的EC50和最大应答。TPP-9809是同种型对照。对于人Treg供体1212 CCR8由40%的细胞表达。

[2230]

ADCP 效力 (人 Treg 供体 1212 + M2c 供体 4)						
无岩藻糖基化	TPP-20965	TPP-21360	TPP-21045	TPP-20950	TPP-20955	TPP-9809
EC50 (pM)	563	27.5	17.1	10.7	13.2	NA
最大应答 (%)	23	23	23	24	23	14
R^2	0.93	0.99	0.99	0.97	0.98	NA

[2231] 表10.3.4.1.6:ADCP测定总结:使用激活的Tregs作为靶细胞和M2c巨噬细胞作为效应细胞的EC50和最大应答。TPP-9809是同种型对照。

[2232]

ADCP 效力 (人 Treg 供体 1100 + M2c 供体 5)						
	TPP-21360		TPP-23411		TPP-9809	
	WT	Afuco	WT	Afuco	WT	Afuco
EC50 (pM)	1855	2003	1607	2188	NA	NA
最大应答 (%)	25	25	26	26	19	21
R^2	0.94	0.90	0.87	0.90	NA	NA

[2233] 表10.3.4.1.7:ADCP测定总结:使用激活的Tregs作为靶细胞和M2c巨噬细胞作为效应细胞的EC50和最大应答。TPP-9809是同种型对照。

[2234]

ADCP 效力 (人 Treg 供体 1261 + M2c 供体 6)						
	TPP-21360		TPP-23411		TPP-9809	
	WT	Afuco	WT	Afuco	WT	Afuco
EC50 (pM)	870	664	1257	613	NA	NA
最大应答 (%)	24	23	23	23	17	18
R^2	0.99	0.97	0.95	0.97	NA	NA

[2235] 表10.3.4.1.7:使用Incucyte实时成像的ADCP测定总结:使用巨噬细胞作为效应细胞和表达人CCR8的HEK细胞作为靶细胞且比率为4:1时的EC50和最大应答。人CCR8表达为80%。TPP-9809是同种型对照。M2c巨噬细胞被接种到超低附着的96孔板中。添加不同浓度的治疗性抗体后,添加pHrodo红色染料(Sartorius#4649)标记的靶细胞,并将板在37℃和5%CO2下孵育。使用Incucyte S3中的20x物镜每30分钟自动获取和分析相差和红色荧光图像,持续12小时(4张图片/孔,3次重复)。ADCP诱导因测试的治疗性野生型抗体而异。

[2236]

ADCP 效力 (人 CCR8-HEK + M2c 供体)						
	TPP-23411	**TPP-29368**	**TPP-29369**	**TPP-27478**	**TPP-27479**	**TPP-9809**
EC50 (pM)	227	326	102	151	79.5	NA
最大应答 (%)	13.7	15.0	13.3	10.9	9.8	6.7
R^2	0.97	0.97	0.96	0.93	0.95	NA

[2237]

[2238] 实施例10.3.4.2:由抗鼠CCR8抗体(替代抗体)介导的ADCP诱导

[2239] 为了比较本发明的人抗人/食蟹猴CCR8抗体与本发明的人抗鼠CCR8替代抗体的行为,后者同样表征了ADCP诱导。对于功能性ADCP测定,原代小鼠骨髓衍生的M2巨噬细胞用作效应细胞,鼠CCR8表达HEK293细胞和BW 5417.3细胞(数据未显示)用作靶细胞。为了产生效应细胞,将鼠骨髓衍生的巨噬细胞接种到24孔板中,并通过添加20ng/ml M-CSF、0.05μg/ml IL-4和0.05μg/ml IL-13极化为M2巨噬细胞。靶细胞用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯染料(CFSE,ThermoFisher)标记,并以效应细胞与靶细胞的比率为2:1添加到效应细胞中。最后,添加不同浓度的替代抗鼠CCR8抗体TPP-15285和同种型对照TPP-10748。共培养2小时后,对细胞进行鼠M2巨噬细胞标志物F4/80染色,并使用流式细胞术测量F4/80+和CFSE+双阳性巨噬细胞的级分来确定吞噬作用的百分比。92%至97%的靶细胞显示鼠CCR8的表达(如通过FACS确定的)。TPP-15285诱导的吞噬作用为~11%,平均EC50为~402pM(表10.3.4.2.1)。最高抗体浓度导致钩效应,进一步支持提议的作用方式。优化的功能性ADCP测定进一步证实ADCP是本发明替代CCR8抗体体内功效的相关作用模式,因此证实抗鼠CCR8抗体TPP-15285适合作为抗CCR8抗体的替代抗体.

[2240] 表10.3.4.2.1:使用岩藻糖基化(野生型)替代CCR8抗体的ADCP测定总结。

[2241]

	TPP-15285	TPP-10748
EC50(pM)	402	NA
最大应答(%)	11	5
R^2	0.93	NA

[2242] 表10.3.4.2.2:使用替代CCR8抗体的ADCP测定。

[2243]

ng/ml	TPP-15285		TPP-10748	
10000	9	9.28	4.26	4.47

[2244]

1000	10.33	11.61	4.96	4.12
100	8.3	8.79	4.93	5.61
10	4.99	4.49	3.6	4.12
1	4.34	4.28	3.59	4.54

[2245] 实施例10.4:CCR8抗体对CCR8信号的调节

[2246] CCL1是CCR8的特异性配体。与CCR8结合后,CCL1可以诱导钙(Ca)通量、趋化性,以及通过β-arrestin信号传导-受体内化,后者可能独立于G蛋白信号传导。抗体至少可以通过6种不同的方式调节GPCR:

[2247] 1.反向激动剂在结合后会平息GPCR的潜在内源性激活。对于CCR8,内源性激活可以是例如～10％。

[2248] 2.偏向β-arrestin或G蛋白的拮抗剂会阻断G蛋白依赖性信号或β-arrestin信号,并且对各自的其他途径没有影响。

[2249] 3.中性拮抗剂可以阻断G蛋白和β-arrestin信号通路。

[2250] 4.完全激动剂激活G蛋白和β-arrestin信号通路。

[2251] 5.偏向β-arrestin或G蛋白的激动剂激活G蛋白信号通路或β-arrestin信号通路,但不能同时激活两者。

[2252] 6.促进二聚化的激动剂交联两个GPCR,例如抗体的不同臂,导致各种信号活动。

[2253] 对于基于ADCC和ADCP的消除肿瘤内Tregs的方法,排除抗体可能对CCR8产生的任何潜在信号效应是理想的。为评估这一点,发明人使用Ca通量测定作为G蛋白依赖性信号传导的读数,并使用β-arrestin激活和磷酸信号传导作为G蛋白非依赖性信号通路的读数。磷酸化Erk1/2参与MAP激酶通路并调节多种细胞应答,而众所周知,磷酸化AKT与PI3激酶通路相关,并已在CCR8中显示参与促进趋化性。AKT通路也参与促进细胞存活和生长,最近,CCL1已被证明可促进CCR8表达细胞的存活(Barsheshet,Yiftah,et al."CCR8+FOXp3+ Treg cells as master drivers of immune regulation."Proceedings of the National Academy of Sciences 114.23(2017):6086-6091.)。

[2254] 实施例10.4.1:用于监测β-arrestin信号传导的DiscoverX测定

[2255] 应答于刺激,即配体的结合-例如CCL1与CCR8-GPCR可以激活G蛋白非依赖性信号,如β-arrestin信号。这会导致趋化因子受体的内化(Fox,James M.,et al."Structure/Function Relationships of CCR8 Agonists and Antagonists.Amino-terminal extension of CCL1 by a single amino acid generates a partial agonist."Journal of Biological Chemistry 281.48(2006):36652-36661)。β-arrestin测定购自DiscoverX。简而言之,CCR8与一个小的酶供体片段ProLink™(PK)在框内融合,并在稳定表达β-arrestin和β-半乳糖苷酶(称为酶接受者或EA)的较大的N-端缺失突变体的融合蛋白的细胞中共表达。CCR8的激活会刺激β-arrestin与PK标记的CCR8结合,并迫使两种酶片段互补,从而形成具有活性的β-半乳糖苷酶。这种相互作用导致酶活性增加,可以使用化学发

光PathHunter检测试剂进行测量。

[2256] 在第一个实验中,抗体或CCL1与共表达用ProLink标记的人CCR8和EA的CHO细胞孵育90分钟,然后添加检测剂。现有技术抗体和本发明抗体均未诱导β-arrestin信号传导(图25)。

[2257] 在下一个实验中,于EC80用CCL1刺激细胞以激活β-arrestin信号传导,并添加本发明的抗体或现有技术抗体以评估它们阻断激活的β-arrestin信号的能力。令人惊讶的是,β-arrestin信号传导被现有技术抗体L263G8和433H阻断,而本发明的抗体TP-23411显示对β-arrestin信号传导没有显著影响,至少达到100nM的浓度(图26)。

[2258] 表10.4.1.1:TPP-23411和现有技术抗体L263G8和433H抑制CCL1诱导的的β-arrestin信号传导的IC50值,单位为nM。对稳定表达用ProLink标记的人CCR8的CHO细胞进行染色。无法确定本发明抗体的IC50,表明TPP-23411不阻断CCL1诱导的β-arrestin信号传导。

[2259]

	TPP-23411	L263G8	433H
含 hCCR8 的 CHO: IC50 单位为 nM	N/A	13.84	0.78

[2260] 实施例10.4.2:磷酸ELISA

[2261] 磷酸化AKT信号传导促进生存和生长,而磷酸化Erk1/2信号传导调节多种细胞响应。磷酸化Erk1/2和磷酸化AKT抗体购自CellSignaling,并根据制造商的方案进行ELISA测定。表达人CCR8或激活的人Treg的CHO细胞用CCL1、TPP-23411、Biolegend L263G8或BD抗体433H处理,或保持未处理作为阴性对照。CCL1作为阳性对照。有趣的是,现有技术抗体Biolegend L263G8和BD抗体433H两者均诱导磷酸化Erk1/2水平(图27、28)以及磷酸化AKT水平(图29、30)的显著增加,例如在激活的人Tregs中15分钟后,本发明抗体的情况并非如此。

[2262] 总之,两种现有技术抗体都对G蛋白非依赖性途径如AKT磷酸化或ERK1/2磷酸化具有激动作用。

[2263] 实施例10.4.3:钙通量测定

[2264] 细胞内钙动员的测量是一种可靠的检测方法,其可以以高通量方式进行以研究化合物或抗体对潜在药物靶点(如CCR8)的影响。为此,可以使用基于荧光的FLIPR钙测定法(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)监测通过释放Ca2+发出的信号的受体的活性。简而言之,将表达人CCR8的CHO细胞接种到测定板中并孵育过夜。然后将细胞加载Ca+敏感染料BUV396/496。

[2265] 对于拮抗功能的测量,通过FLIPR Tera监测Ca通量信号,这与向细胞中添加不同浓度的抗体或参考化合物(MC148)同时开始。将细胞与抗体或参考化合物孵育1分钟后,添加CCL1激动剂,并通过FLIPR Tetra额外记录钙通量信号3分钟。为测量激动功能,平行添加抗体/参考化合物以通过FLIPR监测Ca通量信号3分钟。

[2266] 表10.4.3.1至10.4.3.4显示了抗鼠或抗人CCR8抗体的钙通量测定结果。无法确定TPP-14099和TPP-21047的IC50。其他本发明抗体的IC 50不同。一般而言,大多数本发明抗体以及现有技术抗体有效阻断CCL1诱导的G蛋白依赖性信号传导。

[2267] 表10.4.3.1:Ca通量测定。表达鼠CCR8的CHO细胞用于测试抗体阻断CCL1诱导的G

蛋白依赖性Ca信号传导的能力。40ng/ml的CCL1用于诱导。TPP-14095和TPP-14099都与小鼠CCR8结合。对于本发明抗体或现有技术抗体，未观察到对G蛋白依赖性Ca信号传导的激动作用(数据未显示)。

[2268]

使用表达鼠 CCR8 的 CHO 细胞的 Ca 通量测定		
	TPP-14095	**TPP-14099**
IC50 (nM)	1.65	N/A

[2269] 表10.4.3.2:Ca通量测定。表达人CCR8的CHO细胞用于测试抗体阻断CCL1诱导的G蛋白依赖性Ca信号传导的能力。CCL1以80ng/ml的浓度使用。

[2270]

	TPP-9809	TPP-18205	TPP-18206	TPP-17577	TPP-17578
IC50(nM)	N/A	1.6	3	93.8	4.53

[2271] 表10.4.3.3:Ca通量测定。表达人CCR8的CHO细胞用于测试抗体阻断CCL1诱导的G蛋白依赖性Ca信号传导的能力。CCL1以60ng/ml的浓度使用。

[2272]

	TPP-9809	TPP-20955	TPP-21045	TPP-21047	TPP-21360
IC50(nM)	N/A	0.52	0.29	N/A	0.50

[2273] 表10.4.3.4:Ca通量测定。表达人CCR8的CHO细胞用于测试抗体阻断CCL1诱导的G蛋白依赖性Ca信号传导的能力。CCL1以60ng/ml的浓度使用。

[2274]

	TPP-9809	**TPP-20955**	**TPP-21360**	**TPP-23411**	**443H**	**L263G8**
山地斜坡（Hill Slope）	~-1.815e+046	~-0.03928	-2.208	-0.8122	-1.048	-0.6795
IC50 (nM)	N/A	~1.02e-025	0.417	1.22	1.3	1.26
跨度比（从最大值到最小	~93.49	~11357	433.9	400.1	995.9	921.2

[2275] **值）**

[2276] 实施例10.5:本发明抗体的内化

[2277] 为了评估CCR8的内化，成像技术被用来可视化这个过程。特异性抗CCR8抗体TPP-21360和TPP-23411以及相应的同种型对照抗体TPP-5657用荧光染料标记。此外，商业抗体L263G8和433H以及鼠抗体SA214G2也与永久染料BODIPY结合。这些抗体在pH 8.3下与2至6摩尔过量的BODIPY®FL染料(酯，D2184，ThermoFisher)进行赖氨酸偶联。缀合后，通过色谱法(PD10脱盐柱1-2.5ml;GE Healthcare)纯化反应混合物以去除过量染料并调节pH值。然后，浓缩蛋白质溶液(VIVASPIN 500，Fa.Sartorius stedim biotec)。使用分光光度计(NanoDrop)测定抗体的染料载量，并使用公式D:P＝Adye εprotein:(A_{280}-0,16Adye)εdye进行计算。靶标特异性抗体TPP-21360和TPP-23411以及同种型对照抗体的染料载量显示在相似的范围内(染料载量/ab:4.0和4.1)。商业抗体引起3.8和3.9的染料负载/抗体。缀合可能对抗体亲和力产生负面影响，因此在细胞结合测定(FACS)中测试缀合抗体对于确保标记不会改变与CCR8(CD198)的结合至关重要(参见图31a，图32a、图34a、b)。然后，偶联抗体可用于使用人CCR8阳性细胞系HuT78和鼠CCR8阳性细胞系BW5147.3进行的内化测定。在处理之前，将表达CCR8的细胞系($2x10^4$/孔)接种在96-MTP(CellCarrier Ultra，

PerkinElmer)中的100μl培养基中。在37℃/5%CO_2条件下孵育18小时后,更换培养基并添加不同浓度的标记抗体(2.5、1μg/ml;重复三次)。对标记的同种型对照抗体(阴性对照)应用相同的处理方案。此外,将亲本CHO-K1细胞系(CCR8阴性细胞)作为计数器筛选(特异性对照)进行类似处理。以动力学方式进行靶标特异性抗体的内化研究。在不同时间点(0小时、0.5小时、2小时、6小时和24小时)后拍摄图像,并通过测量总内化荧光强度/细胞来确定内化功效。使用Operetta CLS(PerkinElmer)进行测量,并使用Harmony高内涵分析软件(PerkinElmer)进行图像数据分析。

[2278] 图31b和32b显示了HuT78细胞中商业抗人CCR8抗体433H和L263G8以及BW5147.3细胞中商业抗鼠CCR8抗体SA214G2的大量内化,而图33显示了低内化或无内化本发明的抗体TPP-21360和TPP-23411,其基本上与同种型对照相当。

[2279] 表10.5.1:发明抗体和现有技术抗体的内化数据总结。n.a:未测试。

[2280]

抗体	**FACS HuT78** [MFI]	**内化** [倍数同种型]	**FACS mBW5147.3** [MFI]	**内化** [倍数同种型]
TPP-23411	600	0	n.a.	n.a.
TPP-21360	600	0	n.a.	n.a.
433H	50	22	n.a.	n.a.
L263G8	40	22	n.a.	n.a.
SA214G2 (鼠)	n.a.	n.a.	48	11

[2281] 为证实低内化确实是用本文所述的硫酸化肽抗原获得的所有本发明抗CCR8抗体的特征,就其内化行为以囊泡区域/细胞作为读取结果分析了表10.5.2中列出的本发明抗体(也参见图89)。使用已知大量内化的抗CD71抗体作为阳性对照。事实上,所有测试的本发明抗人CCR8抗体都是非内化抗体,即未表现出显著程度的内化的抗体。有趣的是,TPP-17577,唯一在HCDR3中不含组氨酸的测试人抗人抗CCR8抗体显示出比在HCDR3中包含组氨酸的所有测试人抗人抗CCR8抗体更高的内化。

[2282] 表10.5.2:本发明抗体的内化数据的总结。n.a:未测试。

[2283]

	内化 HuT78	内化 HUVEC
TPP-17577	n.a.	无
TPP-17578	n.a.	无
TPP-18205	n.a.	无
TPP-18206	n.a.	无
TPP-20955	无	无
TPP-21047	无	无

[2284]

TPP-23411	无	无
TPP-27495	无	无
TPP-27496	无	无
TPP-18429	无	无
TPP-18430	无	无
TPP-18432	n.a.	无
TPP-18433	n.a.	无
TPP-18436	无	无
TPP-19571	n.a.	无
TPP-27478	无	无
TPP-27477	无	n.a.
TPP-27479	无	无
TPP-27480	无	无

[2285] 实施例10.6.1:抗CCR8抗体的FcRn亲和层析

[2286] 新生儿Fc受体(FcRn)与体内IgG抗体代谢过程的调节有关。在血管内皮细胞核内体的酸性环境中与FcRn结合可保护IgG免受溶酶体降解。IgG从FcRn释放到血流中发生在生理pH 7.4。因此,FcRn在pH＜6.5时与IgG结合,在生理pH 7.4时不结合。IgG和FcRn之间的相互作用对IgG的体内药代动力学有影响。通过固定化FcRn模拟抗体循环相互作用来表征pH依赖性的IgG与FcRn的结合,可以揭示有助于其药代动力学的IgG特性。

[2287] FcRn亲和力运行在Äkta Pure 25层析系统上于25℃下进行。FcRn柱(Roche,订单号8128057001;预装了大约1mL树脂;结合容量:≥100μg IgG)用运行缓冲液A平衡:20mM MES/HCl pH 5.5140mM NaCl。将30μL的每种抗体(在平衡缓冲液中为1mg/mL)上样到色谱柱。通过增加运行缓冲液B 20mM Tris/HClpH 8.8 140mM NaCl的百分比产生线性pH梯度,如下所示:0分钟-20％B,10分钟-20％B,80分钟-100％B,90分钟-100％B,93分钟-20％B,103分钟-20％B。流速为0.5mL/min。监测洗脱点的pH值并从Unicorn 7.1生成的色谱图中读取。

[2288] 从表10.6.1.1可以看出,现有技术抗体Ustekinumab作为标准药代动力学的对照,现有技术抗体Briakinumab作为快速药代动力学的对照(参见Schoch,Angela,et al."Charge-mediated influence of the antibody variable domain on FcRn-dependent pharmacokinetics."Proceedings of the National Academy of Sciences 112.19(2015):5997-6002)。TPP-17577、TPP-18205、TPP-27495、TPP-21047和TPP-27496显示出大于pH 7.5的洗脱pH,并且可以认为在pH 7.4至pH 7.5下也显示出与FcRn的结合。测得的pH值可用于预测抗体的清除率和半衰期。

[2289] 表10.6.1.1:不同抗体的FcRn亲和层析:洗脱时的pH。两个pH值表示双峰。

[2290]

TPP Nr.	洗脱pH
Ustekinumab	7.22
27478	7.25
27477	7.25

19571	7.25
23411	7.38
20955	7.38
18436	7.38
18432	7.38
27479	7.43
23480	7.5
18433	7.5
18430	7.5
18429	7.5
18206	7.5
17578	7.5
17577	7.50/7.69
18205	7.50/7.77
Briakinumab	7.85
27495	7.88
21047	8
27496	8.13

[2291] 实施例10.6.2:基于SPR的FcRn结合分析

[2292] 为了评估抗CCR8抗体对FcRn的结合亲和力,使用SPR在pH6.0和pH 7.4研究了结合。结合测定在Biacore T200仪器上在25℃下使用CM5传感器芯片和测定缓冲液PBST进行。对于FcRn结合测定,将人、小鼠或食蟹猴FcRn胺偶联到CM5传感器芯片表面(～300RU),并将IgG以15.6-2.000nM的浓度注入PBST,pH 6。再生是用PBST pH 7.4进行。在另一项仅在pH 7.4下进行的实验中,IgG以2μM的一个浓度进行测试,因此仅在发生结合时才对其进行定性评估。KD值来自稳态亲和力分析以及通过拟合1:1结合等温线的动力学分析。

[2293] 从表10.6.2.1可以看出,如前所述,Ustekinumab作为阳性对照,Briakinumab作为阴性对照,如Schoch et al,2015所描述。这两种抗体对FcRn的亲和力没有显著差异,但它们在pH 7.4时对FcRn的结合应答存在差异。因此,可以假设在pH 7.4下表现出结合应答的抗体可能具有加速的体内半衰期。

[2294] 实施例10.7:抗CCR8抗体的肝素亲和层析

[2295] 对于本发明的识别人CCR8的抗体,很可能是电荷介导的相互作用,因为抗体识别带电荷的抗原酪氨酸基序并具有特定的结构组成,例如关于他们的HCDR3。然而,除了在pH 7.4下结合FcRn之外,电荷介导的相互作用是IgG降解的驱动力。与单核细胞或巨噬细胞的带负电荷的糖萼结合可能导致胞饮作用和随后的蛋白水解降解。Kraft et al.表明当与FcRn层析一起进行肝素亲和层析时,可以更有效和准确地预测体内抗体行为(Kraft,Thomas E.,et al."Heparin chromatography as an in vitro predictor for antibody clearance rate through pinocytosis."MAbs.Vol.12.No.1.Taylor&Francis,2020)。

[2296] 表10.6.2.1:本发明抗体对不同FCRN受体的亲和力的SPR分析。

[2297] 小结合应答定义为＜30RU的应答,结合应答为＞30RU。

[2298]

抗体	配体: FcRn	pH 6.0 下的结合 [KD 以 M]	pH 7.4 下的结合 [KD 以 M]	配体: FcRn	pH 6.0 下的结合 [KD 以 M]	pH 7.4 下的结合 [KD 以 M]	配体: FcRn	pH 6.0 下的结合 [KD 以 M]	pH 7.4 下的结合 [KD 以 M]
TPP-27496	人	1.4E-08	结合应答	cyno	8.9E-09	结合应答	小鼠	1.6E-08	结合应答
TPP-27495	人	2.9E-08	结合应答	cyno	3.0E-08	结合应答	小鼠	3.3E-08	结合应答
TPP-27480	人	6.1E-08	结合应答	cyno	6.2E-08	结合应答	小鼠	1.2E-07	结合应答
TPP-27479	人	8.3E-08	结合应答	cyno	9.0E-08	结合应答	小鼠	5.0E-08	结合应答
TPP-27478	人	9.7E07	无应答	cyno	8.5E-07	无应答	小鼠	1.3E-07	无应答
TPP-27477	人	1.1E-06	小/无结合应答	cyno	1.0E-06	小/无结合应答	小鼠	1.7E-07	小/无结合应答
Ustekinumab	人	2.0E-07	无应答	cyno	2.6E-07	无应答	小鼠	7.1E-08	小 结合应答
Briakinumab	人	2.3E-07	结合应答	cyno	1.6E-07	结合应答	小鼠	5.6E-07	结合应答
TPP-21047	人	6.5E-08	小结合应答	cyno	4.0E-08	小结合应答	小鼠	1.7E-07	小结合应答
TPP-18436	人	5.7E-08	结合应答	cyno	5.3E-08	结合应答	小鼠	3.3E-08	结合应答
TPP-18433	人	5.8E-08	结合应答	cyno	5.4E-08	结合应答	小鼠	4.2E-08	结合应答
TPP-18432	人	8.0E-08	结合应答	cyno	8.5E-08	结合应答	小鼠	2.7E-08	结合应答
TPP-18430	人	7.4E-08	结合应答	cyno	6.9E-08	结合应答	小鼠	5.2E-08	结合应答
TPP-18429	人	8.1E-08	结合应答	cyno	7.6E-08	结合应答	小鼠	6.1E-08	结合应答
TPP-18205	人	9.6E-08	无应答	cyno	7.9E-08	无应答	小鼠	1.0E-07	无应答
TPP-17577	人	5.5E-08	结合应答	cyno	6.6E-08	结合应答	小鼠	4.3E-08	结合应答
TPP-18206	人	1.4E-07	结合应答	cyno	2.7E-07	结合应答	小鼠	2.1E-07	结合应答
TPP-17578	人	1.0E-07	小结合应答	cyno	1.3E-07	小结合应答	小鼠	3.8E-08	小结合应答
TPP-20955	人	5.4E-08	小结合应答	cyno	4.0E-08	小结合应答	小鼠	5.8E-08	小结合应答
TPP-23411	人	5.1E-08	小结合应答	cyno	7.0E-08	小结合应答	小鼠		

[2299]

TPP-9809	人	1.4E-07	无应答	cyno	4.0E-07	无应答	小鼠	2.8E-08	无应答
TPP-9809	人	1.6E-07	无应答	cyno	4.1E-07	无应答	小鼠	3.9E-08	无应答
TPP-19571	人	1.3E-06	小结合应答	cyno	1.2E-06	小结合应答	小鼠	1.9E-07	结合应答

[2300] 高亲和力、高水平的相互作用以及因此的高保留时间可以预示测试抗体的半衰期较短。肝素亲和力运行在Äkta Pure 25层析系统上于25℃下进行。乙酰肝素柱(Tosoh)用

运行缓冲液A平衡:50mM TRIS,pH 7.4。将50μL的每种抗体(在20mM组氨酸pH 5.5中为1mg/mL)上样到柱上。通过增加运行缓冲液B 20mM Tris pH 7.41M NaCl的百分比生成线性盐梯度,如下所示:注射后2分钟-0%B,0-55%B超过16.5分钟,100%超过0.5分钟,100%B四分钟。流速为0.8mL/min。监测洗脱时间并从Unicorn 7.1生成的色谱图中读取。

[2301] 从表10.7.1可以看出,并且如前所述,Ustekinumab作为阳性对照,Briakinumab作为阴性对照。大多数测试的本发明抗体集中在15至18分钟的保留时间附近。因此,如果静电相互作用在体内起作用,这些抗体可能会显示出缩短的半衰期。

[2302] 表10.7.1:不同抗体的肝素亲和层析:洗脱时的pH。

[2303]

TPP-Nr.	保留时间 (分钟)
Ustekinumab	11.95
TPP-17578	13.53
TPP-23411 (afuco)	15.02
TPP-27478	15.05
TPP-27495	15.29
TPP-19571	15.29
TPP-27496	15.34
TPP-27477	15.35
Briakinumab	15.78
TPP-23411 (wt)	15.86
TPP-18205	16.02
TPP-21047	16.06
TPP-27480	16.09
TPP-18436	16.21
TPP-20955	16.73
TPP-18432	17.01
TPP-18206	17.24
TPP-18206	17.51
TPP-18430	17.54

[2304]

TPP-18429	17.54
TPP-18433	17.56
TPP-17577	18.06

[2305] 实施例10.8:食蟹猴中的毒性研究和CCR8耗竭

[2306] 食蟹猴用50mg/kg的TPP-23411处理四个星期。这些动物没有表现出中毒迹象。在最后一次治疗后一周,使用RNA-seq分析胸腺组织(在健康组织中具有最高水平的CCR8)。在用抗CCR8抗体治疗的动物中,发现CCR8 mRNA水平显著降低。在较低剂量的TPP-23411下,未发现CCR8水平显著降低。

[2307]

	N	CCR8 表达的平均 log2	CCR8 表达的 SD log2	T-test p-value 与同种型相比
同种型	2	7.386	0.128	-
TPP-23411	2	5.459	0.346	0.0537

[2308] 实施例11:靶标的治疗适用性

[2309] 对于免疫肿瘤学中特定靶标的治疗用途,靶标的特异性表达对于最大限度地减少全身副作用至关重要。靶标应对目标组织或细胞具有特异性,例如用于肿瘤内Treg,不得在健康组织上表达。此外,靶标在特定肿瘤组织中的表达增加可能指向该适应症的医学用途。例如,CCR8也在B细胞淋巴瘤和T细胞淋巴瘤肿瘤细胞系中表达。

[2310] 全身性去除Treg细胞不仅可以激发和增强肿瘤免疫力,还可以激发和增强自身免疫力,这在患有免疫失调-多内分泌病-肠病-X连锁(IPEX)综合征的患者身上得到了证明。在这种疾病中,患者由于基因改变而缺乏Tregs,如果没有接受适当的免疫抑制治疗,患者会在出生后的前2年内因全身性自身免疫而死亡。因此,认为旨在去除或抑制肿瘤内Treg的靶标的高特异性对于避免治疗性抗体的副作用非常重要,例如针对CCR4靶向抗体观察到的副作用。

[2311] 实施例11.1:靶标CCR8的特异性

[2312] 在第一项分析中,发明人评估了CCR8 mRNA在不同人体组织和细胞类型中的表达。仅在激活的调节性T细胞以及肿瘤浸润淋巴细胞中观察到CCR8 mRNA的显著表达(图35)。

[2313] 在第二项分析中,发明人评估了50种不同肿瘤适应症中的CCR8 mRNA表达。具有最高CCR8表达的适应症是例如乳腺癌、肺腺癌(ADC)、睾丸癌、胃癌和鳞状细胞癌(SCC)、头颈部恶性肿瘤以及食管肿瘤,但在结直肠癌、卵巢癌和宫颈癌中也有高表达。在除胰腺癌和黑色素瘤以外的所有适应症中,发现与相应的正常组织相比,肿瘤中的表达更高(图36)。

[2314] 在第三项分析中,发明人评估了CCR8 mRNA与FOXP3 mRNA在各种肿瘤适应症中的共表达。与Treg标记FOXP3的共表达对于证明CCR8确实主要在Tregs上表达很重要,参见表11.1.1。IHC染色证实了这些发现,见图37。

[2315] 表11.1.1:CCR8和调节性T细胞定义标志物FOXP3是所有9588个TCGA肿瘤样本(不包括作为适应症的胸腺瘤)中最密切相关的基因,表明这些基因在同一细胞类型中共表达。该表显示了与CCR8和FOXP3 mRNA表达水平及其各自的Pearson相关系数r最密切相关的25个基因(在35021个基因中)。

[2316]

CCR8		**FOXP3**	
CCR8	1.000	FOXP3	1.000
FOXP3	0.828	CCR8	0.828
ICOS	0.814	ICOS	0.821
CCR4	0.813	TIGIT	0.804
TIGIT	0.762	CTLA4	0.766
P2RY10	0.760	SIRPG	0.747
CD80	0.748	SLAMF1	0.741
TNFRSF9	0.746	CCR4	0.737
CD3G	0.741	IL2RB	0.737
SLAMF1	0.726	CD5	0.733
IL7R	0.724	P2RY10	0.727
IL2RB	0.716	CD3G	0.724
CTLA4	0.715	TNFRSF9	0.723
CD5	0.713	CXCL9	0.721
ITK	0.713	CD2	0.720
IL2RA	0.711	GBP5	0.718

[2317]

LAX1	0.707	UBASH3A	0.714
IKZF3	0.699	CD3E	0.713
GBP5	0.699	CXCR6	0.713
CXCR6	0.693	CXCR3	0.712
SIRPG	0.690	LTA	0.712
CD2	0.689	CD80	0.710
CSF2RB	0.688	CD6	0.708
SLAMF7	0.683	ITK	0.706
CXCL9	0.681	CXCL13	0.704

[2318] 此外，还评估了CCR8 mRNA与泛T细胞标志物CD3、细胞毒性T细胞标志物CD8、巨噬细胞标志物MS4A7、一般炎症标志物IFNg和B细胞标志物CD19、CD20、CD22的相关性，用于50种肿瘤适应症，参见表11.1.2。有趣的是，对于几乎所有适应症，相关性都非常显著，表明在免疫细胞浸润到肿瘤本身，尤其是T reg浸润时，CCR8的表达增加。由此可以预期，免疫细胞浸润，特别是T细胞浸润同样是有价值的生物标志物，可用于患者分层以识别更有可能从抗CCR8疗法中获益的患者。

[2319] 表11.1.2:CCR8和Treg标志物FOXP3、泛T细胞标志物CD3、细胞毒性T细胞标志物CD8、巨噬细胞标志物MS4A7、一般炎症标志物IFNg或B细胞标志物CD19、CD20、CD22的log2 mRNA水平之间的Pearson相关系数r。结果表明，在TCGA的50种适应症中，有48种CCR8与免疫细胞特别是T reg浸润到肿瘤中具有高度显著的共表达。因此可以预期，例如T细胞浸润构成了一种有价值的分层生物标志物，用于识别可能从抗CCR8疗法中获益的患者。

[2320]

适应症	N	调节性 T 细胞 (FOXP3)		泛 T 细胞 (CD3E + CD3D + CD3G)		细胞毒性 T 细胞 (CD8A + CD8B)	
		r	pv	r	pv	r	pv
头颈癌-口腔癌-SCC	79	0.916	1.87E-83	0.791	1.22E-45	0.661	2.51E-27
乳腺癌-ADC 导管-TPBC	150	0.641	1.70E-09	0.584	8.82E-08	0.448	8.80E-05
头颈癌-喉癌-SCC	276	0.928	1.51E-36	0.717	2.42E-14	0.576	1.20E-08
肺癌- NSCLC-ADC-混合	132	0.901	3.77E-40	0.763	9.07E-22	0.580	4.79E-11
乳腺癌-ADC-导管-TNBC	197	0.870	1.30E-31	0.729	1.13E-17	0.602	4.20E-11
胃癌- ADC	165	0.853	2.87E-45	0.747	4.64E-29	0.677	3.04E-22
肺癌- NSCLC-ADC	134	0.829	4.51E-82	0.689	2.92E-46	0.486	2.83E-20
胃癌-ADC-肠道	198	0.726	1.65E-13	0.684	1.40E-11	0.596	1.70E-08
胃癌- ADC-弥散	63	0.825	2.90E-18	0.665	4.52E-10	0.597	6.23E-08
睾丸癌-生殖细胞瘤-精原细胞瘤	619	0.328	4.35E-03	0.367	1.32E-03	0.255	2.85E-02
肺癌- NSCLC-SCC	99	0.895	2.21E-168	0.775	1.43E-96	0.589	6.11E-46
胸腺瘤	71	0.351	8.31E-05	0.372	2.81E-05	0.357	6.14E-05
食管癌- ADC	177	0.909	9.69E-35	0.780	2.17E-19	0.697	3.21E-14
乳腺癌-ADC-导管	336	0.783	4.02E-129	0.675	1.58E-83	0.570	1.28E-54
胃癌-ADC-肠-管	89	0.895	1.11E-27	0.812	5.44E-19	0.594	1.57E-08
乳腺癌-ADC-小叶	96	0.848	3.26E-50	0.730	9.15E-31	0.642	5.98E-22
胰腺癌-ADC-导管	156	0.864	5.89E-45	0.697	1.14E-22	0.621	4.96E-17
结直肠癌- ADC	69	0.902	7.12E-124	0.703	2.54E-51	0.513	6.34E-24
食管癌-SCC	75	0.832	7.93E-26	0.653	5.31E-13	0.578	7.03E-10
头颈癌- SCC	76	0.836	7.80E-53	0.548	7.42E-17	0.435	1.68E-10
乳腺癌- ADC	83	0.781	4.14E-14	0.687	5.12E-10	0.549	3.20E-06
子宫癌-宫颈-SCC-非角化	207	0.809	1.19E-27	0.536	7.66E-10	0.368	5.71E-05
子宫癌-宫颈-SCC-角质化	197	0.853	1.29E-16	0.637	1.75E-07	0.595	1.70E-06
膀胱癌-移行细胞癌	534	0.828	7.54E-71	0.680	7.75E-39	0.501	5.68E-19
卵巢癌-ADC-囊腺癌-乳头状浆液	66	0.545	4.22E-25	0.491	4.53E-20	0.381	5.07E-12
子宫癌-宫颈-SCC	127	0.804	3.16E-20	0.681	1.02E-12	0.644	3.76E-11
肾癌- ccRCC	77	0.835	5.60E-140	0.655	8.13E-67	0.553	4.86E-44
皮肤癌-黑色素瘤	86	0.797	5.44E-	0.798	1.66E-105	0.721	7.80E-77

			105				
甲状腺癌-乳头状癌-经典变体	356	0.829	3.81E-93	0.610	2.53E-38	0.365	7.48E-13
间皮瘤-上皮样	319	0.843	1.98E-16	0.760	7.00E-12	0.691	2.65E-09
肉瘤-恶性纤维组织细胞瘤	108	0.828	6.76E-14	0.621	1.15E-06	0.569	1.31E-05
前列腺癌-ADC-腺泡型	477	0.773	7.89E-97	0.708	1.88E-74	0.559	5.85E-41
膀胱癌-乳头状移行细胞癌	57	0.889	6.39E-46	0.743	1.97E-24	0.662	5.43E-18
子宫癌-子宫内膜-ADC-子宫内膜样	307	0.686	2.58E-16	0.498	4.11E-08	0.381	4.82E-05
子宫癌-子宫内膜-ADC-乳头状浆液	147	0.405	1.60E-03	0.381	3.15E-03	0.301	2.17E-02
肉瘤-去分化脂肉瘤	482	0.799	5.61E-14	0.649	3.66E-08	0.560	4.97E-06
肉瘤-平滑肌肉瘤	106	0.838	4.58E-29	0.754	1.04E-20	0.710	1.53E-17
肝癌- HCC	58	0.405	1.77E-15	0.674	1.52E-48	0.558	1.64E-30
甲状腺癌-滤泡癌	51	0.398	3.47E-05	0.251	1.08E-02	0.041	6.80E-01
脑癌-胶质瘤-星形细胞瘤-胶质母细胞瘤	472	0.616	1.34E-18	0.612	2.31E-18	0.492	1.86E-11
肾癌-乳头状瘤-II 型	74	0.755	4.86E-17	0.688	2.38E-13	0.648	1.54E-11
肾癌-乳头状瘤	120	0.858	4.77E-38	0.618	1.04E-14	0.618	9.58E-15
子宫癌-子宫内膜癌-肉瘤-恶性混合苗勒氏瘤	102	0.716	3.73E-10	0.573	3.20E-06	0.378	3.79E-03
肾癌-乳头状瘤-I 型	363	0.781	5.15E-17	0.460	2.58E-05	0.482	9.16E-06
肾癌-恐色症	84	0.227	6.63E-02	0.179	1.50E-01	0.177	1.55E-01
肾上腺癌-肾上腺皮质癌	55	0.176	1.21E-01	0.363	1.01E-03	0.333	2.72E-03
肾上腺癌-嗜铬细胞瘤	114	0.455	4.92E-09	0.377	1.99E-06	0.340	2.09E-05
脑癌-胶质瘤-星形细胞瘤	108	0.620	2.70E-22	0.541	2.29E-16	0.473	2.32E-12
脑癌-胶质瘤-少星形细胞瘤	58	0.479	4.70E-09	0.553	4.19E-12	0.427	2.70E-07
脑癌-胶质瘤-少突胶质瘤	57	0.217	2.11E-03	0.295	2.46E-05	0.236	7.98E-04

[2321]

[2322]

适应症	**N**	**巨噬细胞 (MS4A7)**		**M2 巨噬细胞 (MRC1)**		**炎症 (IFNg)**		**B cells (CD19 + MS4A1 + CD22)**	
		r	**pv**	**r**	**pv**	**r**	**pv**	**r**	**pv**
头颈癌-口腔癌-SCC	79	0.742	1.62 E-37	0.57 8	7.11 E-20	0.50 5	8.98 E-15	0.610	1.82E-22

	乳腺癌-ADC 导管-TPBC	150	0.107	3.75 E-01	0.37 1	1.44 E-03	0.55 2	5.92 E-07	0.404	4.78E-04
	头颈癌-喉癌-SCC	276	0.740	1.40 E-15	0.68 7	7.76 E-13	0.31 7	3.52 E-03	0.434	4.20E-05
	肺癌- NSCLC-ADC-混合	132	0.534	2.74 E-09	0.62 3	5.84 E-13	0.46 4	4.25 E-07	0.520	7.74E-09
	乳腺癌-ADC-导管-TNBC	197	0.622	6.43 E-12	0.60 7	2.82 E-11	0.44 6	3.70 E-06	0.563	1.30E-09
	胃癌- ADC	165	0.675	4.00 E-22	0.70 4	1.26 E-24	0.62 9	1.52 E-18	0.435	1.42E-08
	肺癌- NSCLC-ADC	134	0.594	7.28 E-32	0.64 2	1.75 E-38	0.41 5	1.03 E-14	0.491	9.47E-21
	胃癌-ADC-肠道	198	0.531	9.78 E-07	0.53 3	8.65 E-07	0.43 6	9.37 E-05	0.501	4.68E-06
	胃癌- ADC-弥散	63	0.684	9.45 E-11	0.59 3	7.99 E-08	0.40 3	5.93 E-04	0.405	5.55E-04
	睾丸癌-生殖细胞瘤-精原细胞瘤	619	-0.040	7.37 E-01	0.42 9	1.35 E-04	0.20 3	8.20 E-02	0.035	7.67E-01
[2323]	肺癌- NSCLC-SCC	99	0.658	2.03 E-60	0.63 3	8.10 E-55	0.49 4	1.09 E-30	0.574	4.27E-43
	胸腺瘤	71	0.147	1.09 E-01	0.03 9	6.69 E-01	- 0.05 5	5.47 E-01	0.228	1.23E-02
	食管癌- ADC	177	0.713	4.46 E-15	0.71 9	2.23 E-15	0.59 8	5.98 E-10	0.662	1.61E-12
	乳腺癌-ADC-导管	336	0.232	5.09 E-09	0.53 8	9.58 E-48	0.60 6	3.17 E-63	0.465	1.62E-34
	胃癌-ADC-肠-管	89	0.703	1.44 E-12	0.74 3	1.50 E-14	0.60 3	7.94 E-09	0.596	1.38E-08
	乳腺癌-ADC-小叶	96	0.264	3.78 E-04	0.48 3	9.41 E-12	0.65 3	7.46 E-23	0.495	2.60E-12
	胰腺癌-ADC-导管	156	0.757	1.55 E-28	0.76 6	1.34 E-29	0.38 9	1.13 E-06	0.423	9.66E-08
	结直肠癌- ADC	69	0.752	1.72 E-62	0.77 0	2.78 E-67	0.43 6	5.18 E-17	0.479	1.09E-20
	食管癌-SCC	75	0.678	3.14 E-14	0.43 1	1.18 E-05	0.55 0	6.51 E-09	0.357	3.57E-04
	头颈癌- SCC	76	0.594	3.86	0.51	8.40	0.42	5.27	0.381	3.41E-

[2324]

			E-20	6	E-15	4	E-10		08
乳腺癌- ADC	83	0.271	3.15 E-02	0.50 5	2.41 E-05	0.60 3	1.73 E-07	0.468	1.11E-04
子宫癌-宫颈-SCC-非角化	207	0.555	1.54 E-10	0.52 7	1.71 E-09	0.34 6	1.59 E-04	0.559	9.91E-11
子宫癌-宫颈-SCC-角质化	197	0.730	2.64 E-10	0.49 8	1.10 E-04	0.45 6	4.65 E-04	0.591	2.03E-06
膀胱癌-移行细胞癌	534	0.509	1.36 E-19	0.59 0	2.75 E-27	0.42 7	1.14 E-13	0.409	1.53E-12
卵巢癌-ADC-囊腺癌-乳头状浆液	66	0.309	3.22 E-08	0.29 3	1.64 E-07	0.41 0	7.12 E-14	0.139	1.49E-02
子宫癌-宫颈-SCC	127	0.629	1.51 E-10	0.57 7	9.49 E-09	0.51 6	5.17 E-07	0.645	3.57E-11
肾癌- ccRCC	77	0.520	2.71 E-38	0.24 5	1.04 E-08	0.57 7	8.41 E-49	0.476	1.71E-31
皮肤癌-黑色素瘤	86	0.614	2.96 E-50	0.63 9	1.74 E-55	0.66 5	1.54 E-61	0.653	9.36E-59
甲状腺癌-乳头状癌-经典变体	356	0.440	1.41 E-18	0.64 9	7.94 E-45	0.44 6	3.63 E-19	0.365	7.05E-13
间皮瘤-上皮样	319	0.465	2.68 E-04	0.31 7	1.64 E-02	0.59 6	9.94 E-07	0.364	5.35E-03
肉瘤-恶性纤维组织细胞瘤	108	0.160	2.63 E-01	0.12 5	3.84 E-01	0.52 7	6.99 E-05	0.524	8.03E-05
前列腺癌-ADC-腺泡型	477	0.594	3.24 E-47	0.59 6	1.25 E-47	0.52 8	7.01 E-36	0.595	1.78E-47
膀胱癌-乳头状移行细胞癌	57	0.607	1.14 E-14	0.70 9	1.80 E-21	0.58 6	1.57 E-13	0.628	7.43E-16
子宫癌-子宫内膜-ADC-子宫内膜样	307	0.456	7.25 E-07	0.42 2	5.28 E-06	0.42 5	4.61 E-06	0.402	1.59E-05
子宫癌-子宫内膜-ADC-乳头状浆液	147	0.369	4.36 E-03	0.34 7	7.66 E-03	0.12 2	3.61 E-01	0.044	7.43E-01
肉瘤-去分化脂肉瘤	482	0.206	1.21 E-01	0.11 8	3.79 E-01	0.48 2	1.26 E-04	0.526	2.25E-05
肉瘤-平滑肌肉瘤	106	0.569	1.97 E-10	0.55 8	5.09 E-10	0.67 4	2.30 E-15	0.491	8.84E-08
肝癌- HCC	58	0.524	1.54 E-26	0.26 3	5.06 E-07	0.55 5	3.42 E-30	0.575	1.09E-32
甲状腺癌-滤泡癌	51	0.243	1.39	0.33	5.99	0.11	2.69	0.171	8.61E-

[2325]

			E-02	4	E-04	0	E-01		02
脑癌-胶质瘤-星形细胞瘤-胶质母细胞瘤	472	0.418	2.23 E-08	0.402	8.97 E-08	0.365	1.44 E-06	0.312	4.52E-05
肾癌-乳头状瘤-II型	74	0.443	1.91 E-05	0.510	5.24 E-07	0.575	6.83 E-09	0.451	1.33E-05
肾癌-乳头状瘤	120	0.457	6.48 E-08	0.492	4.23 E-09	0.651	1.13 E-16	0.512	7.97E-10
子宫癌-子宫内膜癌-肉瘤-恶性混合苗勒氏瘤	102	0.370	4.58 E-03	0.213	1.12 E-01	0.519	3.49 E-05	0.277	3.69E-02
肾癌-乳头状瘤-I型	363	0.206	7.19 E-02	0.252	2.70 E-02	0.609	4.04 E-09	0.527	8.67E-07
肾癌-恐色症	84	0.326	7.52 E-03	0.262	3.36 E-02	0.246	4.68 E-02	0.165	1.86E-01
肾上腺癌-肾上腺皮质癌	55	0.394	3.32 E-04	0.327	3.24 E-03	0.273	1.48 E-02	0.084	4.59E-01
肾上腺癌-嗜铬细胞瘤	114	0.221	6.66 E-03	0.225	5.71 E-03	0.315	8.80 E-05	0.191	1.94E-02
脑癌-胶质瘤-星形细胞瘤	108	0.348	5.53 E-07	-0.023	7.48 E-01	0.543	1.57 E-16	0.502	6.07E-14
脑癌-胶质瘤-少星形细胞瘤	58	0.212	1.40 E-02	0.133	1.26 E-01	0.627	5.05 E-16	0.214	1.30E-02
脑癌-胶质瘤-少突胶质瘤	57	0.148	3.77 E-02	0.029	6.82 E-01	0.338	1.07 E-06	0.097	1.76E-01

[2326] 实施例11.2:与T效应细胞相比,CCR8对肿瘤内Treg的特异性

[2327] 关于人类癌症免疫疗法的Treg耗竭,有几个问题需要考虑。Treg和激活的效应T细胞通常共享相同类型的细胞表面分子的表达,包括CD25和CTLA-4,这使得很难在不影响这些效应T细胞的情况下用这些分子特异性抗体来选择性地耗竭Treg。

[2328] 肿瘤中的Foxp3+CD25+CD4+ Treg细胞(肿瘤浸润或肿瘤内Treg)相比于淋巴或非淋巴组织或血液中的Tregs,表达更高水平的与T细胞激活相关的细胞表面分子,例如CD25、CTLA-4、PD-1、LAG3、TIGIT、ICOS、和TNF受体超家族成员包括4-1BB、OX-40和GITR。此外,肿瘤浸润性Treg表达高水平的特异性趋化因子受体,包括CCR4和CCR8。

[2329] CD4+CD25+分选和未分选的PBMC用抗CD3和抗CD28珠子+IL2激活6天。FACS分析显示CCR8蛋白表达优先在受刺激的Tregs(CD4+CD25+FoxP3+CD127dim)上表达,参见图38。替代靶标OX40、GITR和CD25但不是CCR8在受刺激的CD8+ Teff细胞和CD4+ T细胞(CD4+CD25+Foxp3-)上显著表达。CCR4显示Treg特异性表达,但没有肿瘤内T reg特异性。这些发现与CCR4抗体显示出免疫学副作用的观察结果一致,这归因于Treg的系统性耗竭。就特异性而言,CCR8似乎在支持肿瘤内Treg的特异性耗竭上更优异。

[2330] 为了证实这些发现,从Guo,Xinyi,et al."Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing."Nature

medicine 24.7(2018):978-985,Zhang,Yuanyuan,et al."Deep single-cell RNA sequencing data of individual T cells from treatment-naive colorectal cancer patients."Scientific data 6.1(2019):1-15,and Zheng,Chunhong,et al."Landscape of infiltrating T cells in liver cancer revealed by single-cell sequencing."Cell 169.7(2017):1342-1356分别获取NSCLC,CRC和肝癌的原始数据,用于分析CCR8特异性,见图39。事实上,对于这些肿瘤,CCR8 mRNA表达主要局限于存在于肿瘤组织中的调节性T细胞(浅灰色框),而大部分在正常组织的调节性T细胞以及CD4辅助性T细胞和CD8细胞毒性T细胞(分别为中灰色和深灰色框)中不存在。

[2331] 人肿瘤裂解物样品的FACS分析证实,CCR8蛋白在非小细胞肺癌(NSCLC)、结直肠癌(CRC)、肾细胞癌(RCC)和淋巴结(LNs,数据未显示)的人肿瘤浸润Treg上特异性表达,图40。高达90%的肿瘤浸润Treg为CCR8阳性,例如在NSCLC中,III+期为40-90%,在I/II期为40-70%,在CRC中为III+期20-40%,在RCC中为III+期40-50%。基于这些数据,认为根据分期进行分层会为接受抗CCR8抗体治疗的患者带来进一步的益处。

[2332] 实施例12:体内实验

[2333] 实施例12.1.1:替代抗体和同基因肿瘤模型

[2334] 在小鼠实验中,结合小鼠CCR8的替代抗体被用于证明抗肿瘤功效并表征作用方式,即肿瘤内的Treg消耗取决于ADCC(抗体依赖性细胞毒性)和ADCP(抗体依赖性细胞吞噬作用)效力。

[2335] 表12.1.1.1:用于体内研究的替代抗小鼠CCR8抗体列表。使用过表达鼠类CCR8的HEK293细胞作为靶细胞,使用NK92细胞作为效应细胞来确ADCC。ADCC活性通过乳酸脱氢酶(LDH)释放来测量。

[2336]

抗 CCR8 抗体	同种型	体外 ADCC 效力
TPP-14095	人 IgG1	未确定
TPP-14099		EC50: 3.14 nM
TPP-18208_aglyco		EC50: > 98 nM
TPP-18209_aglyco		未确定
TPP-15285	小鼠 IgG2a	EC50: 0.5 nM
TPP-15286		未确定
TPP-9809	人 IgG1	非结合同种型对照
TPP-10748	小鼠 IgG2a	非结合同种型对照
TPP-15726	人 IgG1	非糖基化同种型对照

[2337] 抗鼠CCR8抗体TPP-14099以3nM的EC50结合表达鼠CCR8的CHO细胞和以13.2nM的EC50结合鼠iTreg,如通过FACS所确定的(数据未显示)。

[2338] 不同的同基因肿瘤模型被用于模拟具有高度免疫浸润的肿瘤以及具有低程度免疫细胞浸润的肿瘤。此外,所使用的模型对已知检查点抑制剂治疗的应答存在偏差,例如用抗CTLA4、抗PD1或抗PD-L1抗体治疗。表12.1.1.2中显示了测试肿瘤模型的概览,其中包含本发明抗CCR8抗体的功效数据。值得注意的是,在各种同基因肿瘤模型中证明了疗效。

[2339] 简而言之,将每100μl PBS、培养基或50%Matrigel混合物通常含有500.000-1.000.000个肿瘤细胞的悬浮液皮下注射到雌性免疫小鼠(例如Balb/c、C57Bl6)的侧腹。在

约60-100立方毫米(通常为100立方毫米)的可触及肿瘤大小下,CCR8抗体施用开始时通常以5-10ml/kg的体积进行10mg/kg的腹膜内注射。在剂量滴定研究中,测试了较低的剂量。各自同种型的非结合抗体用作对照。组包括n=10只小鼠。治疗每周应用两次,通常作为q3/4d时间表,每周测量3次肿瘤大小和体重。肿瘤生长数据绘制为随时间变化的平均体积。

[2340] 在二抗治疗后24小时,肿瘤和组织样本取自经过相同处理的卫星动物(每组n=5),并在解离成单细胞和红细胞裂解后通过流式细胞术进行分析,特别关注每100mg组织中调节性T细胞(Treg)的绝对数量的变化。用于确定激活的Treg的标志物是CD45+CD4+CD25+FoxP3+。其他FACS标志物包括CD8、NKp46、4-1BB、F4/80、CD11c、Gr1和MHCII。

[2341] 表12.1.1.2:具有表征治疗结果的参数的不同肿瘤模型的概述。基于同基因小鼠肿瘤模型中抗CCR8替代抗体的最终肿瘤体积,通过Treg耗竭、总体响应率和肿瘤对照的比率来测量功效。[1]Treg耗竭计算为同种型对照中肿瘤内Treg与用治疗性抗体治疗的肿瘤中的肿瘤内Treg之间的百分比差异。[2]总缓解率(ORR)和完全缓解(CR)基于RECIST标准对小鼠模型中肿瘤快速生长的适应性(CR:完全缓解(<初始肿瘤体积的10%);PR:部分缓解(最大300%的初始肿瘤体积);NR:无响应者(>300%的初始肿瘤体积))。[3]T/C指研究结束时治疗肿瘤体积/对照肿瘤体积。n.d.:未确定。[4]该肿瘤模型中几项研究的平均值。

[2342]

模型	TPP (10 mg/kg)	Treg 耗竭 (%)[1]	CD8+T 细胞/ Treg 比率	ORR[2] (%CRs)	T/C vol[3]
CT26[4]	14099	78.3	56	58 (30)	0.15
H22		n.d.	n.d.	0 (0)	0.30
4T1		n.d.	n.d.	20 (0)	0.42
Hepa1-6		n.d.	n.d.	10 (0)	0.45

[2343]

C38		45.5	17	4.5 (0)	0.55
MC38		n.d.	n.d.	0 (0)	0.78
LL/c		n.d.	n.d.	0 (0)	0.85
MBT2		n.d.	n.d.	10 (10)	0.86
RM-1		n.d.	n.d.	0 (0)	0.99
B16Bl6		n.d.	n.d.	0 (0)	1.06
CT26[4]	15285	82.3	64	72 (30)	0.18
EMT-6		61.6	3	90 (0)	0.28
F9		73.2	54	60 (30)	0.21
C38		68.2	16	40 (30)	0.23
B16F10-OVA		59.0	77	0 (0)	0.37
A20		28.0	3	40 (30)	0.46
4T1		37.1	1	0 (0)	0.90
B16F10		7.5	3	0 (0)	0.95
EG7-ova		n.d.	n.d.	0 (0)	0.86
PANC02		n.d.	n.d.	10 (0)	0.51
MBT2		n.d.	n.d.	30 (20)	0.40
MC38		n.d.	n.d.	30 (0)	0.35
MC38		n.d.	n.d.	0 (0)	0.58
J558		n.d.	n.d.	0 (0)	0.89
RENCA		n.d.	n.d.	0 (0)	0.81
Colon26		n.d.	n.d.	0 (0)	0.50
KLN205		n.d.	n.d.	0 (0)	0.79

[2344] 对于每个同基因小鼠肿瘤模型，同种型对照组和抗CCR8治疗组中的10个肿瘤在治疗周期结束时、最后一次治疗后24小时(每两周治疗一次，直到任一组中的肿瘤达到3000mm^{3}的平均体积)收获，并通过RNA-seq测量全基因组mRNA表达。在通过RNA-seq评估的17个模型中，13个模型与对照组相比显示出抗CCR8治疗组的CD8mRNA水平升高，其倍数变化如表12.1.1.3所示。对于CT26、H22、RM1、MBT2和Hepa1-6模型，根据T检验统计，CD8水平的增加是显著的，表明在治疗周期结束时细胞毒性T细胞浸润显著增加。这些数据强烈表明CD8+细胞参与影响肿瘤响应。

[2345] 表12.1.1.3:抗CCR8处理诱导的CD8 mRNA水平的变化。

[2346]

模型	倍数变化	T检验p-值
CT26	8.604	8.7E-08
H22	7.160	1.7E-09
RM1	3.105	3.1E-03
MBT2	2.716	1.3E-09
WEHI-164	1.680	1.4E-01
Hepa1-6	1.621	2.7E-02
LL2	1.315	1.3E-01
PANC02	1.242	5.4E-01

KLN205	1.194	5.2E-01
RENCA	1.188	6.7E-01
Colon26	1.137	7.6E-01
B16BL6	1.022	9.3E-01
J558	0.924	8.6E-01
MC38	0.898	6.2E-01
4T1	0.499	8.8E-02
EG7-OVA	0.449	4.3E-02

[2347] 实施例12.1.2:用于生物标志物识别的同基因模型表征

[2348] 基于来自同基因模型的早期肿瘤的全基因组RNA-seq数据,发现以下基因水平的升高与肿瘤响应密切相关:Eif3j2,Eno1b,Ifi441,Hist1h2a1,Ifi202b,Hmga1b,Amd2,Sycp1,Itln1,Trim34b,Catsperg2,Zfp868,Serpina1b,Prss41,Clrb,Cyld,Ccnb1ip1,Masp2,Acaa1b,C4a,Snord93,Abhd1,Serpina3h,H2-K2,Cd1d2,Hal,Rnf151,Rbm46,Arg2,Mir8099-2,Igsf21,Olfr373,Cls2,Crym,Arv1,Hddc3,Plppr4,Ppplr11,Rps3a2,Zfp459,Rnd1,Serpina1a,Vcpkmt,Atp10d,Gbp2b,H2-T24,Tlcd2,Ctse,H2-Q10,Cyp2c55,Borcs8,Tpsab1,Trim43b,Cc2d1a,Serpina1d,Cacna1a,Kcnj14,Ttc13,Farsa,Olfr1217,Jam1,H2-B1,Tnpo2,Rims3,Dock9,Car5b,Atp1a4,H2-Q1,Zfp69,Slpi,Pcdhgb8,Ocel1,Selenbp2,Nsd3,Wt1,Nap112,Ranbp9,Gtpbp3,AY761185,Rnaset2a,Serpina3i,Ell2,Gal3st2b,Urb2,F12,Klk1,Ifi214,Cstl1,Agtpbp1,Msh5,Cox18,Zfp330,Ttc37,Klk4,H2-Q5,Cxcl11,Rab39,Pm20d1,Nod2,H2-DMb2。有趣的是,该集合高度富集了早期补体因子、补体调节因子(如Serpins)和MHC组分。这些标志物或其组合可用于分层或预测或监测肿瘤响应。特别是,高水平补体C1/C4的存在可能有助于Treg裂解。当补体因子的耗竭/消耗降低Treg耗竭的功效时,补充补体系统,例如在联合治疗中可能是一种选择。

[2349] 不同的同基因模型进一步表征了免疫细胞亚群的绝对数量和肿瘤中总CD45+免疫细胞的频率。对于通过流式细胞术分析的模型(表12.1.2.1),B16F10的特点是免疫细胞数量最少-并且肿瘤体积减少最少,参见表12.1.2.1。因此,免疫细胞浸润可用于分层以预测对CCR8抗体治疗的应答。这个假设后来可以用B16B16来证实。

[2350] 表12.1.2.1:通过在早期时间点(第二次治疗后24小时)分析的载剂组肿瘤中免疫细胞亚群的绝对数量和总CD45+免疫细胞内的频率表征肿瘤微环境。T/C vol描述了研究结束时CCR8抗体治疗组(10mg/kg,每周两次)与对照组的肿瘤体积比率。

[2351]

绝对免疫细胞数量							
模型	**T/C vol**	**CD45+**	**CD8+**	**CD4+ conv**	**Treg**	**NK 细胞**	**Mph**
CT26	0.18	1368322	192436	74946	66189	271952	54108
F9	0.21	535626	19741	21068	13965	50021	33206
EMT-6	0.28	1178255	9201	26504	18767	10016	290251
B16F10-OVA	0.37	388299	80015	26337	9948	68771	33597
4T1	0.42	399181	17992	11636	32076	16386	52023
A20	0.46	548792	144609	77894	80907	26629	85936
C38	0.55	525455	176380	57803	37518	36523	17514
B16F10	0.95	57459	2633	3269	653	6558	20057

[2352]

相对免疫细胞数量						
模型	**T/C vol[1]**	**CD45+的 CD8+%**	**CD45+的 CD4+ conv %**	**CD45+的 Treg%**	**CD45+的 NK 细胞%**	**CD45+的 Mph%**
CT26	0.18	14.1	5.5	4.8	19.9	4.0
F9	0.21	3.7	3.9	2.6	9.3	6.2
EMT-6	0.28	0.8	2.2	1.6	0.9	24.6
B16F10-OVA	0.37	20.6	6.8	2.6	17.7	8.7
4T1	0.42	4.5	2.9	8.0	4.1	13.0
A20	0.46	26.4	14.2	14.7	4.9	15.7
C38	0.55	33.6	11.0	7.1	7.0	3.3
B16F10	0.95	4.6	5.7	1.1	11.4	34.9

[2353] 实施例12.2:在CT26荷瘤小鼠中的功效

[2354] 用抗CCR8抗体TPP-15285和TPP-15286治疗在CT26荷瘤小鼠中显示出很强的抗肿瘤功效(图41)。TPP-15285在0.1mg/kg的最低剂量下显示疗效降低,其他剂量依赖性差异不显著。正如预期的那样,抗PD-L1抗体("PDL1")在模型中表现出中等功效。各同种型的非结合抗体未显示任何功效。

[2355] 相应治疗组的蛛网图(个体小鼠的肿瘤随时间的生长)(图42)清楚地证明了同质性强的功效,在所有剂量组中都出现了两种抗CCR8抗体的完全响应。

[2356] 在二抗治疗后24小时,通过流式细胞术对CT26肿瘤样本进行的Treg分析显示,与同种型对照组相比,抗CCR8抗体治疗组中的Treg数量大大减少。在TPP-15285的情况下,Treg消耗明显是剂量依赖性的(图43)。

[2357] 表12.2.1:来自图43的相应数据。

[2358]

CT26	Mean # Tregs	% Tregs relative to iso ctrl	Mean # CD8+ T cells	% CD8+ T cells relative to iso ctrl	Ratio CD8+ T cells:Tregs	Ratio CD4+ conv cells:Tregs
mIgG2a Iso	162741	100	437223	100	3	1
TPP-15285, 10mg/kg	20872	13	1239497	283	64	9
TPP-15285, 1mg/kg	53303	33	716253	164	16	4
TPP-15285, 0.1mg/kg	76360	47	684058	156	10	2
TPP-15286, 10mg/kg	16321	10	624631	143	44	7
TPP-15286, 1mg/kg	14349	9	765654	175	87	11
TPP-15286, 0.1mg/kg	23202	14	1421674	325	68	11
mIgG1 iso	87365	100	326799	100	4	1
anti-PDL1, 10mg/kg	10702	123	313229	96	3	1

[2359] 9

[2360] 实施例12.3:作用模式研究

[2361] 实施例12.3.1:在负荷CT26肿瘤的小鼠中进行的ADCC/ADCP作用模式研究

[2362] 与糖基化抗体相比,可在原核宿主中产生的非糖基化抗体显示出几乎相同的抗原结合亲和力、生理温度下的稳定性和体内血清持久性。然而,N-连接聚糖的缺失几乎消除了所有FcγR结合亲和力和免疫效应子功能,这些功能对于通过ADCC或ADCP清除抗体调理的靶细胞至关重要。为了为基于ADCC/ADCP的作用模式提供证据,生成了抗体的非糖基化版本作为阴性对照。

[2363] TPP-18208和TPP-18209是抗CCR8替代抗体的糖基化人IgG1版本,无法通过Fc-γ受体结合效应细胞,例如NK细胞和/或巨噬细胞。这些抗体在负荷CT26肿瘤的小鼠中测试了抗肿瘤功效,并与包含相同序列(TPP-14095、TPP-14099)的相应野生型/糖基化对应物进行了比较。此外,该研究还包括抗CCR8抗体TPP-15285和TPP-15286(糖基化,mIgG2同种型)。

[2364] 野生型抗体显示出很强的抗肿瘤功效,而与同种型对照相比,非糖基化抗体未显示出任何功效(图44)。蜘蛛图说明了每个治疗组中个体小鼠的结果(图45)。因此,通过流式细胞术进行的离体肿瘤分析证明仅在用野生型(糖基化)抗体处理后Treg耗竭,而与相应的非结合同种型对照相比,非糖基化抗体未显示Treg耗竭(图46)。

[2365] 这些结果证实了ADCC和/或ADCP是CT26肿瘤中抗CCR8抗体耗竭Treg的主要作用模式。

[2366] 实施例12.3.2:B细胞或T细胞的参与以及CD8+细胞耗竭或CD19+细胞耗竭对抗CCR8抗体抗肿瘤功效的影响

[2367] 为了测试肿瘤浸润性CD8+ T细胞或CD19+ B细胞的存在与抗CCR8抗体的抗肿瘤功效的相关性,发明人使用了基因修饰的C57BL6小鼠,该小鼠在谱系特异性Cd8a+或谱系特异性Cd19+启动子的控制下表达白喉毒素受体(DTR)。注射白喉毒素(DT)后,CD8+ T细胞或CD19+ B细胞从小鼠血液(数据未显示)以及皮下携带的同基因MC38肿瘤中定量耗竭(表12.3.2.1)。

[2368] 正如预期的那样，CD8+ T细胞的耗竭完全消除了抗CCR8治疗的抗肿瘤作用，导致肿瘤生长与同种型对照组相同(图87)。这些结果证实了本发明的抗CCR8抗体的抗肿瘤功效依赖于CD8+T细胞的存在。

[2369] 相反，非常令人惊讶的是，耗竭CD19+ B细胞显著增加了TPP15285的功效(图88)，导致T/C比率从0.35降低到0.16(T检验p值＝0.032)。因此，建议将抗CCR8治疗与B细胞耗竭或B细胞耗竭剂(如抗CD19抗体或抗CD20抗体，如利妥昔单抗)相结合，以进一步改善临床癌症治疗。

[2370] 表12.3.2.1:白喉毒素处理的DTR小鼠中CD8a和CD19表达的消耗。

[2371]

治疗 (N = 10 每组中)	平均 log2 Cd8a (mRNA 水平)	平均 log2 Cd19 (mRNA 水平)
DTR 小鼠 + 同种型 [TPP-10748]	6.919	1.333
DTR 小鼠 + 抗-CCR8 [TPP-15285, 10mg/kg]	7.380	2.002
CD19-DTR + DT + 同种型	7.466	0.406
CD19-DTR + DT + 抗-CCR8 [TPP-15285, 10mg/kg]	9.039	0.000
CD8-DTR + DT + 同种型	0.711	1.766
CD8-DTR + DT + 抗-CCR8 [TPP-15285, 10mg/kg]	2.736	1.592

[2372] 表12.3.2.2:评估CD19+ B细胞耗竭或CD8+ T细胞耗竭影响的治疗组。

[2373]

组	治疗	剂量	路径	给药方案	T/C (CD8 耗竭)	T/C (CD19 耗竭)
01a	同种型对照	10mg/kg	i.p.	BIW	1	1
01b	抗-CCR8 抗体 TPP15285	10mg/kg	i.p.	BIW	0.58	0.35
02a	同种型对照 用 0.015 mg/kg 白喉毒素	10mg/kg	i.p.	BIW	1.39	0.75

[2374]

02b	抗-CCR8 抗体 TPP15285 用 0.015 mg/kg 白喉毒素	10mg/kg	i.p.	BIW	1.01	0.2

[2375] 实施例12.3.3:CT26同基因肿瘤小鼠中CD8/FOXP3比率增加的时间过程

[2376] 为了获得对免疫细胞水平的一些机制见解，在用TPP15285或同种型对照处理的CT26同基因肿瘤小鼠中监测CD8和FOXP3的mRNA水平。直接在施用第一剂之前以及施用第一剂后12小时、24小时、36小时、48小时、72小时收获10个肿瘤用于RNA-seq分析。类似地，在施用第二、第三和第四剂量的TPP15285后24小时收获肿瘤。对所有肿瘤进行RNA-seq分析以测量鼠Foxp3、CD8a和CD8b1 mRNA水平。计算平均Cd8a和Cd8b1与Fopx3比率的比率，并通过T检验计算对照组和TPP15285治疗组之间比率差异的显著性。

[2377] CD8与FOXP3 mRNA的比率在同种型对照和TPP15285治疗后最早时间点之间的值在0.9和2.0左右之间变化，但随后在TPP15285组中分别在第一次给药后72小时、第二次给药后24小时和第三次给药后24小时显著增加到5.8、3.9和4.4，表明TPP15285显著耗竭了调节性T细胞。在第4次给药后24小时，比值回落至2.6。

[2378] 表12.3.3.1:在施用TPP15285或同种型对照后不同时间点测量的mRNA水平的CD8/

FOXP3比率。

[2379]

时间点	TPP15285 CD8 / FOXP3 比率	同种型 CD8 / FOXP3 比率	T-检验 p-值
11 天, 第一剂量后 0 小时	1.433	1.822	4.0E-01
11 天, 第一剂量后 12 小时	0.900	1.468	1.7E-01
12 天, 第一剂量后 24 小时	1.589	0.911	2.5E-01
12 天, 第一剂量后 36 小时	1.965	1.012	1.3E-01
13 天, 第一剂量后 48 小时	2.386	0.976	5.5E-03
14 天, 第一剂量后 72 小时	5.755	1.721	4.3E-02
15 天, 第二剂量后 24 小时	3.882	2.028	9.4E-02
18 天, 第三剂量后 24 小时	4.424	1.727	3.7E-03
22 天, 第四剂量后 24 小时	2.579	1.870	1.6E-01

[2380] 实施例12.4:CCR8抗体TPP-15285在EMT6荷瘤小鼠中的功效

[2381] 实施例12.4.1:CCR8抗体TPP-15285在EMT6荷瘤小鼠中的功效一一不同剂量

[2382] 抗CCR8替代抗体TPP-15285在EMT6荷瘤小鼠中表现出剂量依赖性功效,在10mg/kg剂量组中效果最强。对于该剂量,TPP-15285具有优于抗CTLA4抗体的功效(图47、图48)。在1mg/kg剂量组中仍然观察到很强的疗效,而0.1和0.01mg/kg剂量组几乎没有疗效。蜘蛛图在个体小鼠水平上说明了这些结果(图49)。

[2383] 在第二抗体治疗后24小时通过流式细胞术对EMT6-肿瘤样品进行的Treg分析显示,与同种型对照组相比,抗CCR8抗体治疗的Treg数量大大减少。Treg耗竭明显是剂量依赖性的(图50)。如先前在文献中所述,还观察到抗CTLA4的Treg耗竭。此外,对于有效剂量组10mg/kg和1mg/kg的TPP-15285以及抗CTLA4,证明了在研究结束时取样的肿瘤中CD8+ T细胞的强烈增加(图51)。表12.4.1.1和表12.4.1.2显示了免疫细胞群的进一步变化。

[2384] 表12.4.1.1:在用不同剂量的CCR8抗体TPP-15285第二次治疗荷瘤EMT6小鼠后24小时或在研究结束时,通过免疫细胞的FACS分析确定免疫细胞群的相对百分比。

[2385]

	EMT6	mIgG2a Iso	TPP-15285, 10mg/kg	TPP-15285, 1mg/kg	TPP-15285 0.1mg/kg	TPP-15285, 0.01mg/kg	Ham IgG iso	aCTLA4 10mg/kg
FACS 第 2 次治疗后 24 小时	CD45+ 相对于同种型的平均 %	100	94	76	93	102	100	87
	CD4conv+相对于同种型的平均 %	100	91	120	121	155	100	52
	CD4+相对于同种型的平均 %	100	59	69	95	135	100	44
	激活的 CD8+相对于同种型的平均 %	100	52	93	70	105	100	47
	NK 细胞相对于同种型的平均 %	100	95	104	135	134	100	82
	CD8+ T 相对于同种型的平均 %	100	61	99	90	113	100	48

[2386]

FACS研究结束时	CD45+相对于同种型的平均%	100	153	116	108	107	100	91
	CD4conv+相对于同种型的平均%	100	245	169	115	112	100	262
	CD4+相对于同种型的平均%	100	209	150	121	119	100	152
	激活的CD8+相对于同种型的平均%	100	532	377	96	67	100	314
	NK细胞相对于同种型的平均%	100	310	179	100	86	100	158
	CD8+ T细胞相对于同种型的平均%	100	529	406	119	88	100	309

[2387] 表12.4.1.2:在用不同剂量的CCR8抗体TPP-15285第二次治疗荷瘤EMT6小鼠后24小时或在研究结束时,通过FACS分析Tregs的相对百分比、CD8:Treg比率或CD4conv:Treg比率。

[2388]

	EMT6	mIgG2同种型	TPP-15285, 10mg/kg	TPP-15285, 1mg/kg	TPP-15285, 0.1mg/kg	TPP-15285, 0.01mg/kg	Ham IgG同种型	aCTLA4 10mg/kg
FACS分析第2次治疗后24小时	Treg相对于同种型的平均%	100	26	22	75	126	100	18
	CD8:Treg比率	1.1	3.2	4.8	1.4	0.9	1.2	4.1
	CD4conv:Treg比率	0.9	3.6	4.6	1.4	1	1.6	5.8
FACS分析研究结束时	Treg相对于同种型的平均%	100	160	125	122	122	100	86
	CD8:Treg比率	1.3	4.6	4.2	1.2	0.9	1.1	4.3
	CD4conv:Treg比率	1.2	1	0.6	0.7	0.6	1.7	1.7

[2389] 实施例12.4.2:CCR8抗体TPP-15285在EMT6荷瘤小鼠中的功效——单次或多次给药

[2390] 小鼠乳腺癌模型EMT-6与TPP-15285一起使用,以测试单次给药与多次给药的影响。测试了四种不同的治疗方案:单次治疗、两次BIW治疗、三次BIW治疗或四次BIW治疗。每组用载剂对照或0.1mg/kg、1mg/kg或5mg/kg的TPP-15285治疗。除了功效研究外,在治疗后24小时、48小时和120小时处死卫星动物进行离体表型分析。抗体施用发生在i.p.但也可以使用其他途径。

[2391] 单次治疗、两次BIW治疗、三次BIW治疗或四次BIW治疗的功效数据显示在图85中。有趣的是,单次剂量治疗适合获得优异的治疗效果。在研究结束时,CD8+肿瘤内T细胞的频率、绝对数量和活化都有所增加,参见表12.4.2.1。然而,在研究结束时,肿瘤内Treg数量和频率或CCR8表达没有差异,参见表12.4.2.2。此外,在研究结束时或研究期间,肿瘤内NK细胞或巨噬细胞数量没有差异(数据未显示)。

[2392] 然而,在时间进程中,在第1次和第2次治疗后肿瘤内Tregs(CD4+CD25+Foxp3+)出现剂量依赖性减少,但在第3次和第4次治疗后不太明显,参见表12.4.2.3。这也在CCR8+Treg中观察到(数据未显示)。此外,CD8+ T细胞的绝对数量随时间增加,参见表12.4.2.4。

因此，与同种型对照相比，CD8与Treg的比率在第一次给药后增加，并且在第四次给药后一直保持高水平。血液样本的特征未显示在不同治疗方案和随时间推移血液中Tregs显著减少或CD8 T细胞增加(数据未显示)。此外，在血液中的NK和巨噬细胞中没有观察到变化(数据未显示)。

[2393] 表12.4.2.1:在研究结束时通过FACS确定的每100mg肿瘤的绝对CD8+细胞。FACS分析揭示了细胞毒性T细胞的频率、绝对数量和激活状态的增加。

[2394]

治疗	载剂 (PBS, 四次治疗)			TPP-15285 0.1mg/kg			TPP-15285 1mg/kg			TPP-15285 5mg/kg		
	平均	SD	n	平均	SD	n	平均	SD	n	平均	SD	n
单次给药	1802	1066	4	3793	1300	5	4435	2787	5	17995	1209	3
2 次治疗				3661	1826	5	6609	3373	5	7752	5470	5
3 次治疗				7800	8399	5	19189	21883	4	7358	4575	5
4 次治疗				10569	8227	5	9099	3561	5	17604	10357	4

[2395] 表12.4.2.2:研究结束时通过FACS确定的每100mg肿瘤的绝对CD4+CD25+FoxP3+ Treg细胞。

[2396]

治疗	载剂	TPP-15285 0.1mg/kg	TPP-15285 1mg/kg	TPP-15285 5mg/kg

[2397]

	(PBS, 四次治疗)											
	平均	SD	n	平均	SD	n	平均	SD	n	Mean	SD	n
单次给药	2751	1624	4	2976	1507	5	2190	892	5	9366	594	3
2 次治疗				2686	1472	5	5011	3179	5	3413	1855	5
3 次治疗				3187	2399	5	5517	5406	4	2214	1508	5
4 次治疗				3041	1449	5	3349	1427	5	7745	6271	5

[2398] 表12.4.2.3:绝对CD4+CD25+FoxP3+ Treg细胞/100mg肿瘤，如卫星动物中通过FACS测定的。

[2399]

	载剂			TPP-15285 0.1mg/kg			TPP-15285 1mg/kg			TPP-15285 5mg/kg		
时间 (治疗 no.之后)	平均	SD	n	平均	SD	n	平均	SD	n	平均	SD	n
24h (1)	13013	2878	4	7526	4116	5	11395	9162	6	10149	8020	5
48h (1)	12187	8549	5	10241	3097	6	4521	2593	6	11149	14745	6
120h (1)	13764	6040	5	9884	5660	6	8975	3810	6	3008	2067	6
24h (2)	14315	11220	3	7836	5964	6	2893	1347	4	1951	1041	6
48h (2)	15022	7702	5	9377	5010	6	3478	2374	6	1540	1495	6
120h (2)	5134	619	5	9567	5948	6	8922	8245	5	3837	2598	6
24h (3)	11789	5191	5	6619	2723	4	4429	3400	6	3462	1954	6
48h (3)	15616	7260	5	7258	3704	4	5879	3175	6	3750	1558	6
120h (3)												
24h (4)												
48h (4)	7011	2911	5	8137	4271	6	12037	7024	5	4293	3191	5

[2400] 表12.4.2.4:卫星动物中通过FACS确定的每100mg肿瘤的绝对CD8+细胞。

[2401]

[2402]

	载剂			TPP-15285 0.1mg/kg			TPP-15285 1mg/kg			TPP-15285 5mg/kg		
时间 (治疗 no.之后)	平均	SD	n	平均	SD	n	平均	SD	n	平均	SD	n
24h (1)	12743	4875	4	7549	4679	5	17691	18215	6	13238	7023	5
48h (1)	9626	4564	5	11880	4806	6	8949	5814	6	16745	15525	6
120h (1)	25694	24727	5	13604	7778	6	56974	26915	6	19107	14265	6
24h (2)	15518	6383	3	19344	10833	6	16597	6630	4	13271	8470	6
48h (2)	18726	8477	4	34655	15707	6	33039	18954	6	14310	7167	6
120h (2)	8122	4436	5	46685	34541	6	38352	38235	5	53765	26430	6
24h (3)	25371	22860	5	18750	8436	4	34955	10345	6	41932	30806	5
48h (3)	32308	23581	5	24993	21998	4	39662	17864	6	69106	23874	6
120h (3)												
24h (4)												
48h (4)	17885	14712	5	32814	19935	6	50298	13584	5	34091	10942	5

[2403] 实施例12.5:抗CCR8抗体TPP-15285在F9荷瘤小鼠中的功效

[2404] 抗CCR8替代抗体TPP-15285在F9荷瘤小鼠中表现出剂量依赖性功效,相比于抗PD-L1抗体的功效,在10mg/kg和1mg/kg剂量组中具有强效,但在0.4mg/kg剂量组中功效降低,(图52、图53)。蛛网图说明了这些在个体小鼠基础上的结果(图54)。

[2405] 在第二抗体治疗后24小时，通过流式细胞术对F9肿瘤样品进行Treg分析，结果显示与同种型对照组相比，10mg/kg剂量抗CCR8抗体治疗组中的Treg数量大大减少。Treg耗竭明显是剂量依赖性的(图55)。抗PD-L1抗体治疗也观察到Treg耗竭。此外，对于TPP-15285的所有剂量组以及抗PD-L1抗体，都证明了肿瘤中CD8+ T细胞的强烈和剂量依赖性增加(图55)。对各种免疫细胞群的进一步影响如图55、图56和表12.5.1所示。

[2406] 表12.5.1:抗CCR8抗体或抗PDL1抗体对免疫细胞群的影响及其在第二次治疗后24小时的比率。

[2407]

	mIgG2a iso	TPP15285, 10mg/kg	TPP15285, 1mg/kg	TPP15285, 0,4mg/kg	mIgG1 iso	PDL1
平均 # Tregs	25324	10642	22734	41111	26435	17105
相对于同种型对照的 Tregs%	100	42	90	162	100	65

[2408]

平均 # CD8+ T 细胞	113947	553074	388731	291603	99850	246400
相对于同种型对照的 CD8+ T 细胞%	100	485	341	256	100	247
比率 CD8+ T 细胞:Tregs	5.1	54.4	15.9	7.7	3.3	15.1
比率 CD4+ conv 细胞:Tregs	2.2	28.5	9.6	4.6	3.0	5.7
平均 # CD45+	435118	1191853	1080867	1042860	578616	615440
相对于同种型对照的的 CD45+ 细胞%	100	274	248	240	100	106
平均 # CD4 conv 细胞	49812	294714	230463	179896	89198	98995
相对于同种型对照的 CD4 conv 细胞%	100	592	463	361	100	111
Mean # CD4 + cells	81866	335500	279725	240886	128434	126134
相对于同种型对照的 CD4+ T 细胞%	100	410	342	294	100	98
平均 # NK 细胞	83353	75576	119531	172201	121590	79803
相对于同种型对照的 NK 细胞%	100	91	143	207	100	66

[2409] 实施例12.6:抗CCR8抗体在联合治疗中的功效

[2410] 进行了各种实验来分析抗CCR8抗体单独或与检查点靶向抗体(如抗PD-L1、抗PD1和抗CTLA4抗体)联合使用的功效。发现与这些检查点靶向分子的组合可提供额外的功效。

此外，还评估了进一步的联合治疗，例如化疗药物如奥沙利铂、多柔比星、吉西他滨或放射治疗。表12.6.1总结了不同联合治疗的结果。如果仅在用抗CCR8抗体治疗开始后才开始用第二种治疗剂治疗，则观察到额外的益处。

[2411] 表12.6.1:抗CCR8抗体联合治疗和结果。

肿瘤模型 [实施例]	**联合疗法**	**结果**	**进一步的益处**
C38 **[12.6.1]**	TPP-15285 (10 mg/kg) **Anti-PD-L1 ab** (3 mg/kg)	CR combo: 8/10; CR 抗-CCR8 ab mono: 3/10; CR 抗-PD-L1 ab mono: 0/10	++
CT26 (大肿瘤) [数据未显示]	TPP-15285 (10 mg/kg) **Anti-PD-L1 ab** (10 mg/kg)	T/C combo: 0.45; T/C 抗-CCR8 ab mono: 0.57; T/C 抗-PD-L1 ab mono: 0.79	+
B16F10-OVA **[12.6.2]**	TPP-15285 (10 mg/kg) **Anti-CTLA4 ab** (10 mg/kg)	T/C combo: 0.13; T/C 抗-CCR8 ab mono: 0.37; T/C 抗-CTLA4 ab mono: 0.30	++
EMT-6 **[12.6.3]**	TPP-15285 (1 mg/kg) **Anti-PD-1 ab** (10 mg/kg)	组合的协同功效; 单疗法无功效	++
C38 (存活) **[12.6.4]**	TPP-15285 (5 mg/kg) **Anti-PD-1 ab** (5 mg/kg)	CR combo: 10/10; CR 抗-CCR8 ab mono: 9/10; CR 抗-PD-1 ab mono: 4/10	++
[2412] MB49 **[12.6.5]**	TPP-15285 (10 mg/kg) **Anti-PD-1 ab (10 mg/kg)** **CCR8 治疗后开始 combo**	T/C combo: 0.16; T/C 抗-CCR8 ab mono: 0.37; T/C 抗-PD1 ab mono: 0.63	++
EMT-6 **[12.6.6]**	TPP-15285 (5 mg/kg) 奥沙利铂 (5 mg/kg) 多柔比星 (6 mg/kg) 多烯紫杉醇 (10 mg/kg)	T/C (天数:19) 抗-CCR8 ab mono: 0.20 奥沙利铂 mono: 0.61 多柔比星 mono: 0.43 多烯紫杉醇 mono: 0.50 与奥沙利铂 combo: 0.26 与多柔比星 combo: 0.19 与多烯紫杉醇 combo: 0.20 Combo: 最终肿瘤 CD8/Treg 比率以及血液中激活 CD8+CD25+T 细胞频率的协同效应	+
Lewis 肺 **[12.6.7]**	TPP-15285 (10 mg/kg) **抗-PD-1 ab** (10 mg/kg) **抗-PD-L1 ab** (10 mg/kg) **抗-CTLA4 ab** (10 mg/kg)	T/C (天数:25) 与 aPD-1combo: 0.67* 与 aPD-L1combo: 0.93 抗-CCR8 ab mono: 0.78	+

[2413]

	抗-CCR8 ab 治疗后开始 combo	抗-PD-1 mono: 0.91 抗-PD-L1 mono: 0.96 抗-CTLA4 mono: 1.10 *研究结束时 CD8+频率和 CD8/Treg 比率增加	
MB49 **[Fig. 68]**	TPP-15285 (10 mg/kg) **抗-PD-L1 ab** (10 mg/kg) **抗-PD-1 ab** (10 mg/kg) **吉西他滨** (100 mg/kg) **抗-CCR8 ab 治疗后开始 combo**	T/C (day:14) 与 aPD-L1 combo: 0.35 与 aPD-1 combo: 0.37 与吉西他滨 combo: 0.56 抗-CCR8 ab mono: 0.61 抗-PD-L1 ab mono: 0.67 抗-PD-1 ab mono: 0.79 吉西他滨 mono: 0.73	++
EMT-6 **[12.6.8]**	TPP-15285 (3 mg/kg) **3 x 2 Gy 放射疗法**	Combo: 0.42 3 x 2 Gy 单独: 0.80 抗-CCR8 ab mono: 0.54	++
MBT2 **[12.6.9]**	TPP-15285 (10 mg/kg) **抗-PD-L1 ab** (10 mg/kg) **抗-PD-1 ab** (10 mg/kg) **紫杉醇** (10 mg/kg, q4d, i.v.)	T/C (天数:24) 与 aPD-L1 ab combo: 0.41 与 aPD-1 ab combo: 0.15 与紫杉醇 combo: 0.39 抗-CCR8 ab mono: 0.5 抗-PD-L1 ab mono: 0.89 抗-PD-1 ab mono: 0.66 紫杉醇 mono: 0.83	++

[2414] 这些结果表明将抗CCR8抗体治疗与其他治疗活性剂相结合的有益影响。发明人还得出结论，如果首先施用抗CCR8抗体，并且如果仅在Treg细胞初始减少(例如至少50％)后才施用进一步的治疗剂，则顺序施用治疗剂会增加额外的益处，例如如实施例12.6.5和12.6.7所示。

[2415] 鉴于这些实验和结果，发明人确信三重组合例如抗CCR8抗体、靶向检查点蛋白的抗体和靶向治疗剂(小分子以及抗体)的组合因为这些治疗作用模式的差异可进一步提高生存率。因此，抗CCR8抗体与检查点靶向抗体和肿瘤细胞靶向抗体或药剂的组合被建议用于肿瘤治疗。在一个优选的实施方式中，该组合是CCR8抗体、抗PD(L)-1抗体和紫杉醇的组合。

[2416] 实施例12.6.1:抗CCR8抗体在C38荷瘤小鼠中的功效以及与抗PD-L1抗体的联合治疗

[2417] 抗CCR8替代抗体TPP-14099和TPP-15285在C38荷瘤小鼠中显示出强大的功效，与抗PD-L1抗体的功效相当(图57a)。TPP-15285与3mg/kg抗PD-L1抗体的组合显示出进一步提高的疗效。两种抗体分别配制在磷酸盐缓冲盐水中，并每周两次以总共四次单独的腹膜内注射方式施用，即在同一天与同时治疗开始组合。

[2418] 在超过94天的生存研究中监测小鼠(图57b)。值得注意的是,用抗CCR8抗体和抗PD-L1抗体组合治疗的小鼠中有8只存活了94天,用CCR8抗体TPP-15285单独治疗的10只小鼠中有4只存活了94天,而没有用单独的抗PD-L1抗体治疗的小鼠存活94天,证实了抗CCR8抗体和PD-L1抗体的协同功效。C38是一种低浸润的同基因小鼠模型,它使用C38结肠癌细胞进行肿瘤诱导。该模型通常被认为对抗PD-L1抗体治疗有应答。鉴于本文所述的可用数据,建议根据T细胞浸润和/或对PD-L1治疗的应答对患者进行分层,以提供额外的益处。

[2419] 在第二抗体治疗后24小时,通过流式细胞术对C38肿瘤样品进行的Treg分析表明,与同种型对照组相比,抗CCR8抗体治疗组中的Treg数量大大减少(图58)。对于TPP-15285与抗PD-L1抗体的组合,观察到最强的Treg耗竭。此外,对于TPP-15285与抗PD-L1抗体的组合,观察到最高的CD8+/Treg比率。有趣的是,巨噬细胞分析显示在研究的第24天有所增加(图59)。

[2420] 实施例12.6.2:抗CCR8抗体在B16F10-OVA荷瘤小鼠中的功效&与抗CTLA4抗体的联合治疗

[2421] 抗CCR8抗体TPP-15285(10mg/kg)在携带B16F10-OVA的小鼠中显示出与抗CTLA4抗体(10mg/kg)的功效相当的强功效(图60)。TPP-15285与抗CTLA4抗体的组合显示协同功效,与CD8+T细胞和IFNg/TNFa水平的增加相关。

[2422] 两种抗体都配制在PBS中,并在同一天与同时开始的治疗相组合,每周两次进行总共三次腹膜内注射。

[2423] 在第二抗体治疗后24小时(第12天)通过流式细胞术对B16F10-OVA肿瘤样品进行的Treg分析表明,与同种型对照组相比,CCR8抗体治疗组中的Treg数量大大减少(表12.6.2.1)。对于TPP-15285与抗CTLA4抗体的组合,观察到最强的Treg耗竭。此外,对于TPP-15285与抗CTLA4抗体的组合,观察到最强的CD8+ T细胞增加。

[2424] 在使用TPP-15285+同种型对照、抗CTLA4抗体+同种型对照或TPP-15285+抗CTLA4抗体进行第二抗体治疗后24小时,B16F10-OVA肿瘤的FACS分析表明肿瘤内Treg频率降低和CD8+ T细胞的绝对数量增加。

[2425] 表12.6.2.1:研究结束时通过FACS确定的肿瘤内细胞群和通过ELISA确定的IFNg。*n=5个样本的平均值。

[2426]

	mulgG2a + hulgG1 同种型	**TPP15285 + hulgG1 同种型**	**aCTLA4 + mulgG2a 同种型**	**TPP15285 + aCTLA4**
绝对 CD45	199442.1	437004.9	611423.6	717324.5
绝对 CD8	25327.0	155532.5	220147.5	312653.9
绝对 Treg	6261.1	9148.6	15413.2	11448.3
abs NK+	11066.6	36950.0	65954.0	57789.1
%NK+	5.9	8.1	10.1	7.6
%CD8	14.6	34.8	36.5	42.7
%Treg	31.58	18.86	23.2	8.98
IFNg (pg/ml 每 mg 蛋白)	3.80	28.83	18.40	35.70

[2427] 实施例12.6.3:在携带EMT-6肿瘤的小鼠中使用抗PD-1抗体和抗CCR8抗体的联合治疗:协同功效

[2428] 单独使用抗鼠CCR8抗体TPP-15285(1mg/kg)、单独使用抗鼠PD-1抗体(CDRs：atezolizumab,10mg/kg)或联合使用TPP-15285(1mg/kg)和抗鼠PD-1抗体(10mg/kg)的治疗效果在EMT-6荷瘤小鼠中进行了评估。两种抗体均在PBS中配制,并在同一天与同时开始的治疗相结合,每周两次进行总共四次腹膜内注射。

[2429] 抗CCR8抗体TPP-15285在1mg/kg的低剂量下在携带EMT-6的小鼠中显示出较弱的功效,与10mg/kg的抗PD-1抗体的弱功效相当(图61)。1mg/kg TPP-15285与10mg/kg抗PD-1的组合显示协同功效。

[2430] 在第二抗体治疗后24小时,通过流式细胞术对EMT-6肿瘤样本进行的Treg分析显示,与同种型对照组或抗PD-1单一疗法相比,CCR8抗体治疗组中的Treg数量大大减少(图62)。

[2431] 表12.6.3.1:在研究结束时通过FACS在EMT-6肿瘤中确定的肿瘤内细胞群。*n＝5个样品的平均值,细胞/100mg肿瘤。

[2432]

肿瘤内免疫细胞	同种型对照	TPP15285 + 同种型对照	Anti-PD1 ab + 同种型对照	TPP15285 + 抗-PD1 ab
CD4+ (*)	48583.4	27646.1	54791.8	42312.3
Tregs (CD4+CD25+FoxP3+) (*)	30686.4	7998.8	28781.7	11506.9
CD8+ T-细胞 (*)	13825.7	16398.8	19233.3	23132.7
NK 细胞 (CD45+CD3+NKp46+) (*)	29119.6	44152.1	51372.0	67155.1
CD8: Treg 比率	0.5	2.1	0.7	2.0

[2433] 实施例12.6.4:在C38荷瘤小鼠中使用抗PD-1抗体和抗CCR8抗体的联合治疗

[2434] 单独使用抗鼠CCR8抗体TPP-15285(5mg/kg)、单独使用抗鼠PD-1抗体(aPD-1,CDR：atezolizumab,5mg/kg)或联合施用TPP-15285(5mg/kg)和抗鼠PD-1抗体(5mg/kg)的治疗功效在C38荷瘤小鼠中进行评估。两种抗体均在PBS中配制,并在同一天与同时开始的治疗相结合,每周两次进行总共四次腹膜内注射。

[2435] 抗CCR8抗体TPP-15285在C38荷瘤小鼠中表现出很强的功效,高于以相同剂量施用的抗PD-1抗体的功效(图63a)。64天后,与抗CCR8单一疗法的9/10和抗PD1单一疗法的4/10相比,5mg/kg TPP-15285与5mg/kg抗PD-1抗体的组合显示出改善的生存功效,具有10/10的完全响应者(图63b)。

[2436] 在第二抗体治疗后24小时,通过流式细胞术对C38肿瘤样品的Treg分析显示在图64、表12.6.4.1中。

[2437] 表12.6.4.1:在第二抗体治疗后24小时,通过FACS在C38肿瘤中测定的肿瘤内细胞群。*n＝5个样本的平均值,细胞/100mg肿瘤。

[2438]

肿瘤内免疫细胞	同种型对照	TPP15285 + 同种型对照	Anti-PD1 ab + 同种型对照	TPP15285 + 抗-PD1 ab
CD4+ (*)	79735.2	109508.8	97352.8	189350.0
Tregs (CD4+CD25+FoxP3+) (*)	27132.4	24495.8	32360.0	48581.6
CD8+ T-细胞 (*)	44063.8	151644.0	160225.4	291992.8
NK 细胞 (CD45+CD3+NKp46+) (*)	124067.0	173865.5	115642.8	295252.5
CD8: Treg 比率	1.7	6.0	4.7	10.2

[2439] 实施例12.6.5:抗CCR8抗体与抗PD-1抗体在MB49荷瘤小鼠中的顺序联合治疗

[2440] 单独使用抗鼠CCR8抗体TPP-15285(10mg/kg)、单独使用抗鼠PD-1抗体(CDR:atezolizumab,10mg/kg)和联合使用TPP-15285(10mg/kg)和抗PD-1抗体(10mg/kg)的治疗功效在MB49荷瘤小鼠的研究中进行了评估。在这项研究中,第一剂抗PD1抗体仅在抗CCR8抗体之后施用,即在允许抗CCR8抗体对Tregs产生影响导致CD8+ T细胞与Treg比率增加之后。更具体地说,在第二次抗CCR8抗体治疗后24小时开始用抗PD1抗体治疗。

[2441] 抗CCR8抗体TPP-15285在携带MB49肿瘤的小鼠中表现出很强的功效,高于抗PD1抗体(图65)。10mg/kg TPP-15285与10mg/kg抗PD-1的组合显示出进一步改善的功效。

[2442] 研究结束时对MB49衍生肿瘤样本的FACS分析显示,与载剂对照组或抗PD-1抗体单一疗法相比,抗CCR8抗体治疗组的CD45+细胞、CD8+细胞和NK细胞频率增加,Tregs频率降低(图66、表12.6.5.1)。

[2443] MB49是一种中等浸润同基因模型,使用对免疫检查点抑制剂(ICI)疗法有响应的膀胱癌细胞。鉴于这些数据,建议对受试者进行低免疫浸润和/或对ICI治疗响应的分层,以为该联合治疗提供额外益处。

[2444] 特别是,发现在抗CCR8抗体治疗后开始联合治疗会带来益处。不受理论的束缚,发明人认为CCR8抗体对Treg的初始消耗增强了抗原呈递细胞的活性和肿瘤T细胞的启动,导致对检查点抑制剂如PD-(L)1的敏感性提高,因为Treg作为肿瘤细胞外在因素在癌症患者对检查点抑制剂的原发性和适应性耐药中发挥作用。

[2445] 表12.6.5.1:在研究结束时通过FACS在MB49肿瘤中确定的肿瘤内细胞群。*n=5个样本的平均值,细胞/100mg肿瘤。

[2446]

肿瘤内免疫细胞	同种型对照	TPP15285	抗-PD1 ab	TPP15285+抗-PD1 ab
CD45+细胞(in % of live)	30.1	53.2	40.9	72.7
Tregs (CD4+CD25+FoxP3+细胞占CD4+细胞的%) (*)	27.6	17.7	20.6	18.6
CD8+细胞(占CD45+的%)	6.3	8.4	8.3	16.3
NK细胞(NKp46+细胞占CD45+细胞的%)	4.0	5.6	3.7	6.4
CD8: Treg比率	11.0	10.9	12.7	20.8

[2447] 实施例12.6.6:在具有EMT-6肿瘤的小鼠中用包含抗CCR8抗体和化学疗法的联合治疗

[2448] 抗CCR8抗体TPP-15285(5mg/kg,q3/4d i.p.)单独、奥沙利铂(5mg/kg,q4d i.p.)单独、多柔比星(6mg/kg,i.v.SD)单独、多烯紫杉醇(10mg/kg,q2dx5,i.v.)单独或TPP-15285与奥沙利铂、多柔比星或多烯紫杉醇的组合的治疗功效在EMT-6荷瘤小鼠中进行了评估。治疗剂在PBS中配制,联合治疗在同一天开始,同时开始治疗。

[2449] 虽然抗CCR8抗体与每种化疗剂的组合提供优于使用该化疗剂的单一疗法的益处,但该组合并不优于抗CCR8单一疗法(图67)。发明人确信,顺序施用治疗剂是有益的,允许抗CCR8抗体在应用化学治疗剂以耗竭快速分裂的细胞之前有效地耗竭Tregs。

[2450] 在研究结束时通过流式细胞术分析了肿瘤和血液中的免疫细胞群,参见表12.6.6.1和表12.6.6.2。对于联合治疗,与每种单一疗法和对照相比,肿瘤内CD8/Treg比率和血液中激活的CD8+CD25+ T细胞的频率增加。

[2451] 此外，还分析了IFN gamma、IL10、IL12p70、IL1beta、IL2和TNFα。在单一和组合组中观察到IFNγ、IL-1b和IL-2水平升高。仅在组合组中观察到TNFα增加(数据未显示)。

[2452] 表12.6.6.1:研究结束时通过FACS确定的肿瘤内细胞群。*如果没有另外说明，n＝5个样本的平均值，细胞/100mg肿瘤。

[2453]

EMT-6, 肿瘤								
	载剂(PBS)	TPP15285	奥沙利铂	多柔比星	多烯紫杉醇	TPP15285+奥沙利铂	TPP15285+多柔比星	TPP15285+多烯紫杉醇
绝对 CD8+ 细胞	19215.4	106043.2	42872.6	43123.8	62549.6	107959.2	61187.0	56554.2
绝对 Tregs	7397.0	12816.0	7075.2	12995.4	20688.0	6358.0	4363.0	4693.8
CD8+细胞/ Treg 比率	2.9	11.1	7.3	2.7	3.1	22.3	15.9	13.0
CD8+ 细胞占 of CD45+ 细胞的%	1.8	14.0	5.9	5.6	5.4	13.1	14.6	9.4
act. CD8+ 细胞占 CD8+ 细胞的%	37.7	13.9	26.8	22.0	17.9	17.1	21.4	23.1
NK 细胞占 CD45+ 细胞的%	5.3	7.9	4.2	5.0	4.8	4.8	8.6	6.5

[2454] 表12.6.6.2:研究结束时通过FACS确定的血液免疫细胞群。*n＝5个样本的平均值，细胞/100μl血液。

[2455]

EMT-6, 血								
	载剂(PBS)	TPP15285	奥沙利铂	多柔比星	多烯紫杉醇	TPP15285+奥沙利铂	TPP15285+多柔比星	TPP15285+多烯紫杉醇
绝对的 CD8+ 细胞	13599.6	12491.2	5208.8	5502.0	9840.2	4094.8	4139.8	7000.8
绝对的 Tregs	1333.2	807.8	511.8	549.2	833.8	390.8	364.8	709.2
绝对的 CD45+ 细胞	188940	166472	120713	104991	105002	47850	65061	121155
CD8+ 细胞/ Treg 比率	12.4	15.6	13.8	12.6	12.2	10.0	13.2	10.2
CD8+ 细胞占 CD45+	7.1	6.9	5.4	5.6	9.5	8.2	6.7	6.3

[2456]

细胞的%								
act. CD8 占 CD8+ 细胞的%	1.6	3.1	2.0	3.5	4.2	6.7	10.7	10.3

[2457] 实施例12.6.7:在Lewis肺癌小鼠中用抗PD-(L)1抗体和抗CCR8抗体进行顺序联合治疗

[2458] 单独抗CCR8抗体TPP-15285(10mg/kg)、单独抗PD-1抗体(aPD-1，CDRs：atezolizumab，10mg/kg)、抗PD-L1抗体(10mg/kg)单独、单独抗CTLA4抗体、TPP-15285(10mg/kg)和抗PD-1抗体(10mg/kg)的组合，或TPP-15285(10mg/kg)和抗PD-L1抗体(10mg/kg)的组合的治疗功效在Lewis肺肿瘤携带小鼠中进行了评估(图69)。抗体在PBS中配制。对

于抗CCR8抗体，在肿瘤接种后第11、14、18和22天施用给药。对于联合治疗，在第二次抗CCR8抗体剂量后24小时开始施用抗PD-(L)1抗体。在这个时间点，FACS分析显示相对于同种型对照TPP-15285单组的肿瘤内Treg消耗为60％(数据未显示)。

[2459] Lewis肺被用作具有抑制性肿瘤微环境的同基因模型，并且已知其对抗PD-(L)1治疗和抗CTLA4治疗没有响应。尽管在第二次治疗后24小时测量到有效的Treg耗竭，但未观察到TPP-15285的单一治疗功效。然而，在抗CCR8抗体后与抗鼠PD-1抗体的联合治疗显示出改善的疗效，这也与研究结束时CD8/Treg比率增加有关(表12.6.7.1)。

[2460] 表12.6.7.1:研究结束时通过FACS确定的肿瘤内细胞群。*n＝5个样本的平均值。

[2461]

肿瘤内细胞	载剂(PBS)	TPP15285	抗-PD-1 ab	TPP15285＋抗-PD-1 ab	抗-PD-L1 ab	TPP15285＋抗-PD-L1 ab
绝对 CD8+	4682.4	7617.0	4593.8	6162.2	5684.4	7769.4
绝对 Tregs	1202.6	1452.0	1207.0	805.8	1480.6	1355.0
CD8/ Treg 比率	4.0	7.9	6.0	7.3	4.7	5.1
% CD8	0.7	0.8	0.6	1.5	0.8	0.9
% 激活的 CD8	19.8	14.9	11.9	12.2	24.5	18.6

[2462] 实施例12.6.8:在携带EMT-6肿瘤的小鼠中用包含抗CCR8抗体和放疗的联合治疗

[2463] 抗CCR8抗体TPP-15285(3mg/kg)或放疗(RT,3x2Gy)单独或组合的治疗效果在EMT-6荷瘤小鼠中进行评估(图70)。联合治疗以3x2Gy分次照射开始，然后是3mg/kg biw x 2。单独的放射治疗仅轻度延迟肿瘤生长。抗CCR8抗体和放疗的组合仅显示出轻微的疗效改善，但研究结束时Treg耗竭比每种单一疗法更明显(数据未显示)。

[2464] 实施例12.6.9:在MBT2荷瘤小鼠中用包含抗CCR8抗体和施用PD-1抗体、PD-L1抗体或紫杉醇的联合疗法

[2465] 如表12.6.9.1所示，在MBT2同基因肿瘤荷瘤小鼠中单独或组合测试本发明的抗CCR8抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体或紫杉醇的治疗功效。每组包括10只荷瘤小鼠，治疗在接种后第10天开始，此时肿瘤已达到约100mm^3的大小。在单一治疗组中，抗CCR8显示出最强和显著的抗肿瘤作用。通过将抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体或紫杉醇这些治疗与抗CCR8疗法相组合显著增加这些疗法的抗肿瘤作用。抗体在PBS中配制。在每两周治疗总共三周后分析T/C比率。

[2466] 表12.6.9.1:第24天治疗组和相对于同种型对照的T/C比率。

[2467]

组	治疗	剂量	途径	给药方案	T/C
01	同种型对照	10mg/kg	i.p.	BIW	1
02	抗-CCR8抗体TPP15285	10mg/kg	i.p.	BIW	0.50
03	抗-PDL1抗体	10mg/kg	i.p.	BIW	0.89
04	抗-PD1抗体	10mg/kg	i.p.	BIW	0.66
05	紫杉醇	10mg/kg	i.v.	Q4D	0.83
06	组合:TPP15285+抗-PDL1 ab	10mg/kg	i.p.+i.p.	BIW+BIW	0.41
07	TPP15285+抗-PD1 ab的组合	10mg/kg	i.p.+i.p.	BIW+BIW	0.15
08	TPP15285+紫杉醇的组合	10mg/kg	i.p.+i.v.	BIW+Q4D	0.39

[2468] 表12.6.9.2:抗CCR8联合治疗后CD8 mRNA水平增加。通过对治疗周期结束后24小时获得的MBT2肿瘤进行的RNA-seq获得CD8mRNA水平。计算来自每个治疗组的10个肿瘤的平均CD8表达水平。与同种型相比,单独的抗CCR8治疗显著增加了CD8水平,而PD1、PDL1和紫杉醇没有显著影响。通过将抗CCR8治疗与其他三种治疗相结合,进一步提高了CD8水平。抗CCR8与抗PD1治疗的组合获得了超过8倍的最显著和最强的增加。

[2469]

治疗	平均 CD8 表达	标准误差	对同种型的倍数变化	T-检验 p-值
误差 [TPP10748]	7.493	1.378	1.000	1.0E+00
抗-CCR8 [TPP15285, 10mg/kg, BIW]	9.308	1.282	3.518	2.5E-04
抗-PD-L1 [10mg/kg, BIW]	7.929	1.448	1.353	3.6E-01
抗-PD1 [10mg/kg, BIW]	8.156	0.915	1.583	1.1E-01
紫杉醇 [10mg/kg, Q4D]	8.260	1.197	1.702	9.2E-02
抗-CCR8 + PDL1	9.805	0.984	4.966	2.3E-06
抗-CCR8 + PD1	10.524	1.078	8.171	9.4E-08
抗-CCR8 + 紫杉醇	9.018	1.088	2.876	6.9E-04

[2470] 表12.6.9.3:第24天的肿瘤大小通过抗CCR8治疗显著减小,并通过将抗CCR8与PD1抗体(CrownVivoPremium,目录号RMP1-14)、PDL1抗体(CrownVivoPremium,目录号CVP034)或紫杉醇的组合进一步减小。与同种型对照相比,肿瘤大小的最大和最显著减少是通过抗CCR8抗体与抗PD1抗体的组合实现的。

[2471]

组	治疗	平均肿瘤大小[mm3]	SD 肿瘤 da 小[mm3]	T / C 比率	T-检验 p-值
1	同种型 [TPP10748]	3108,8	697,9	1	1,00E+00
2	抗-CCR8 [TPP15285, 10mg/kg, BIW]	1539,9	1431,4	0.50	1,38E-02
3	抗-PD-L1 [10mg/kg, BIW]	2758,1	972,3	0.89	4,33E-01
4	抗-PD1 [10mg/kg, BIW]	2051,7	1491,6	0.66	1,03E-01
5	紫杉醇[10mg/kg, Q4D]	2566,2	963,7	0.83	2,53E-01
6	抗-CCR8 + PDL1	1274,9	1159,0	0.41	1,68E-03
7	抗-CCR8 + PD1	473,1	571,7	0.15	4,12E-06
8	抗-CCR8 + 紫杉醇	1197,1	826,4	0.39	3,14E-04

[2472] 实施例12.7.1抗PD-L1抗休应答与抗CCR8抗体应答之间的相关性

[2473] 为了比较抗CCR8抗体治疗与抗PD-L1抗体治疗的疗效,汇集了不同同基因肿瘤模型的结果,见表12.7.1.1。令人惊讶的是,对抗PD-L1抗体治疗的良好应答如通过T/C体积测量的那样,也可预测对抗CCR8抗体治疗的良好应答。PD-L1表达是选择抗PD-L1治疗应答者的已知预测因子。根据这些观察结果,发明人假设PD-L1表达可能同样适用于对受试者进行分层,以便识别最有可能从抗CCR8抗体治疗中获益的受试者。可以通过将PD-L1表达水平与肿瘤体积相关联来追溯验证这一假设。

[2474] 表12.7.1.1不同同基因模型对抗PD-L1抗体与抗CCR8抗体的应答比较。

[2475]

	肿瘤模型	总体免疫细胞浸润	T/C_{vol} (实验结束时)		% Treg 耗竭 [1]	肿瘤内 CD8+ 改变*	ORR [#] (% CR)
			aCCR8	aPDL1	aCCR8	aCCR8	aCCR8
响应模型	CT26	高	0.18	0.68	82.3	2.84 [1]	72 (30)
	EMT-6	中等	0.28	0.68	61.6	5.89	90 (0)
	F9	中等	0.21	0.25	73.2	4.85 [1]	60 (30)
	C38	低	0.23	*0.58*+	68.2	1.32 [1]	40 (30)
	B16F10-OVA	低	0.37	n.d.	59.0	6.14	0 (0)
无响应模型	4T1	中等	0.90	>0.9**	37.1	2.37	0 (0)
	B16F10	低	0.95	>0.9**	7.5	1.39	0 (0)

[2476] 实施例12.7.2:用于分层或疾病控制的抗肿瘤响应与mRNA生物标志物之间的相关性

[2477] 早期未治疗肿瘤(大小为100-200mm^3,每个模型N=10)、较大的未治疗肿瘤(500和1000mm^3)或研究结束时的平均基因表达(RNA-seq)与使用TPP-14099或TPP-15285治疗的21只同基因小鼠模型的T/C比率相关,如本文别处所述。

[2478] 发现顶级相关基因显著富含T细胞和炎症标志物(皮尔逊相关值),参见表12.7.2.1。炎症标志物IFNg和IFNg应答基因(例如Gbp3/4/5/8/9、Cxcl9、Acod1)、PDL1(CD276)、C1补体因子、T细胞基因如Klra3/5和Trav,以及Treg标志物CD25(IL2RA)、FOXP3和CTLA4是与与应答最相关的基因。

[2479] 表12.7.2.2显示了早期未治疗肿瘤的应答细胞系(T/C<0.6)与非应答细胞系(T/C>0.6)的表达倍数变化。列出了应答者和非应答者之间具有最大表达倍数变化的100个基因。IFNg和IFNg应答基因(例如Gbp2/3/4/8/10/11、Cxcl9/11、Ubd)、细胞毒性T细胞标志物(例如颗粒酶、Prf1)以及肥大细胞标志物(Tpsab1、Cma1、Tpsb2)和C1补体因子是最能预测应答的基因。

[2480] 表12.7.2.3显示了对于较大的未治疗肿瘤(500和1000mm^3),应答细胞系(T/C<0.6)与非应答细胞系(T/C>0.6)的表达倍数变化。

[2481] 表12.7.2.1、12.7.2.2和12.7.2.3中列出了候选生物标志物。因此,可以预期具有这些基因的人对应基因或这些基因的人对应基因的组合或特征的高表达的患者对临床中的抗CCR8治疗有响应。此外,这些标志物或它们的组合也可用于监测治疗成功。源自斜体/粗体基因的生物标志物是特别优选的。

[2482] 表12.7.2.1与用本发明的抗CCR8抗体实现的抗肿瘤响应相关的合适的生物标志物。这些生物标志物被发现在早期未治疗的肿瘤中上调,并与治疗响应相关。源自斜体/粗体的基因的生物标志物是特别优选的。列出了表达和T/C比率之间具有最大负相关系数(显示r值)的100个基因。

[2483]

基因	R	基因	R	基因	R	基因	R
Grin2d	-0.658	Fkbp15	-0.583	Cfb	-0.558	Dnah7a	-0.539
Olfr1395	-0.656	***Irf1***	-0.582	Prm1	-0.556	Yipf4	-0.538
Olfr1122	-0.655	Eif3h	-0.579	***Gbp5***	-0.556	***C1ra***	-0.538
Gbp8	-0.638	Rab8a	-0.578	Stat1	-0.556	***Trav9n-1***	-0.534
Mir8098	-0.626	Xpa	-0.578	Nfkbiz	-0.554	Ccdc9	-0.533
Ifng	-0.62	Suox	-0.578	***Klra5***	-0.553	***Gbp3***	-0.533
Eny2	-0.618	Scgb1b30	-0.578	Ano8	-0.552	***Foxp3***	-0.533
Hebp1	-0.614	Rarres2	-0.574	Slc12a9	-0.552	Epb41l4a	-0.533
Cd274	-0.614	Ywhag	-0.573	Nr1h2	-0.552	***Klra3***	-0.533
Gbp10	-0.613	Fgl2	-0.573	Aip	-0.552	***Il15***	-0.532
Esyt2	-0.611	Wdtc1	-0.572	Shisa5	-0.551	Myo1e	-0.529
Clic6	-0.607	***Ctla4***	-0.571	Bcl2a1c	-0.55	Wdr60	-0.529
Greb1l	-0.606	Batf2	-0.571	Fam32a	-0.548	Trim56	-0.528
Trav7d-3	-0.604	Olfr56	-0.571	Tatdn1	-0.547	Ppp1r15a	-0.526
Pinc	-0.603	Cnep1r1	-0.571	Cd200r4	-0.547	Iigp1	-0.526
Cenpt	-0.602	Emp1	-0.57	***Gbp4***	-0.546	Fes	-0.524
Cxcl9	-0.601	Klf4	-0.567	***Ccl8***	-0.545	Trim12c	-0.523
Fam26f	-0.6	Hrh4	-0.566	Ttc39c	-0.544	Psmg4	-0.523
Il2ra	-0.6	***Gbp9***	-0.566	Klk10	-0.544	Igfbp5	-0.521
Hectd2	-0.596	Nlrp9c	-0.565	Crybg1	-0.543	Itgb1	-0.52
Chmp5	-0.593	Fam129b	-0.564	Gnb2	-0.542	Klf9	-0.518
Pcdhb22	-0.59	***Tlr6***	-0.562	Ctsg	-0.542	Actr1a	-0.518
Slitrk4	-0.589	***Icos***	-0.562	Olfr1396	-0.542	***Sh2d1a***	-0.517
Il18bp	-0.586	Tmsb15a	-0.56	***Acod1***	-0.54	Siah1a	-0.516
Cyth2	-0.585	Pla2g15	-0.559	ENS87554	-0.54	***Ccl11***	-0.516

[2484]

[2485] 表12.7.2.2与用本发明的抗CCR8抗体实现的抗肿瘤应答相关的合适的生物标志物。应答细胞系(T/C<0.6)与非应答细胞系(T/C>0.6)的表达倍数变化。发现最相关的(pearson)基因显著富含T细胞和炎症标志物。

[2486]

基因	Log-倍数变化	基因	Log-倍数变化	基因	Log-倍数变化	基因	Log-倍数变化
Gbp2b	4.6	Serpinb9b	2.6	Prkg2	2.2	Pak3	2.0
Msln	4.4	***Gbp4***	2.5	Batf2	2.2	***C1rb***	2.0
Klk10	4.2	Itgb4	2.5	Nppb	2.2	Itgbl1	2.0
Mcpt2	3.5	***Gzmf***	2.5	***C1s2***	2.2	Serpina3g	2.0
Gbp10	3.4	***Gzmd***	2.5	Dio2	2.2	Itih2	2.0
Foxg1	3.2	AW112010	2.5	Bdnf	2.2	***Tpsb2***	2.0
Tpsab1	3.2	***Ido2***	2.5	Itgb6	2.2	Phex	2.0
Ifi44l	3.1	***Gbp2***	2.4	Ar	2.2	Hal	2.0
Syt8	3.1	Iigp1	2.4	Tgtp2	2.2	Clcf1	2.0
Cxcl9	3.0	Notum	2.4	Tnni2	2.2	***Ifi47***	2.0
Hectd2	2.9	***Gbp3***	2.4	Styk1	2.1	Fam26f	2.0
Lgals7	2.9	Tgtp1	2.4	H19	2.1	***Trbc1***	2.0

[2487]

Ido1	2.8	***Cxcl11***	2.4	Rpl39l	2.1	Il34	2.0
Zfpm2	2.8	Irx2	2.3	Inhba	2.1	Serpina3f	2.0
Dynap	2.7	Tmem200a	2.3	Zfp985	2.1	Grem1	2.0
Cdh17	2.7	***Ifng***	2.3	S100a7a	2.1	Btc	2.0
Gzmb	2.7	Klhdc8a	2.3	Olfr56	2.1	Sox9	2.0
Ubd	2.7	Fst	2.3	Gjb4	2.1	Klf4	1.9
Gbp11	2.6	Trpm6	2.3	***Nkg7***	2.1	Pi15	1.9
Mcpt1	2.6	Syt12	2.3	Ankrd1	2.1	Slit2	1.9
Gzmg	2.6	***Gbp5***	2.3	Rab27b	2.0	Gprc5a	1.9
Ifi202b	2.6	Cntnap4	2.3	Klf5	2.0	***Gbp8***	1.9
Greb1l	2.6	***Gzmc***	2.3	Eps8l2	2.0	***Cma1***	1.9
Brinp3	2.6	***Prf1***	2.3	Epb41l4a	2.0	Mgp	1.9

[2488] 表12.7.2.3基于大的未治疗肿瘤(500mm^{3}和1000mm^3)的应答者和无应答者之间具有最大倍数变化的基因的合适生物标志物。应答者模型中颗粒酶和其他免疫细胞标志物的表达高于无应答者模型。特别优选源自斜体/粗体基因的生物标志物。

[2489]

基因	Log-倍数变化	基因	Log-倍数变化	基因	Log-倍数变化	基因	Log-倍数变化	基因	Log-倍数变化
Foxg1	4.6	Itgb4	2.9	Sorcs2	2.5	Aicda	2.3	Fas	2.0
Msln	4.5	Rarres1	2.9	***Gzmc***	2.5	Lhx2	2.3	Klk4	2.0
Zfpm2	4.3	Dcn	2.9	Prrx2	2.5	Dpep1	2.3	Sema5a	2.0
Klk10	4.2	Osr1	2.8	Lef1	2.5	Lancl3	2.3	Lrch2	2.0
Dynap	4.0	Inhba	2.8	Ighg1	2.5	Ereg	2.2	Fam189a1	2.0
Ar	3.8	Greb1l	2.8	Chrna1	2.5	Foxa1	2.2	***Tpsb2***	2.0
Fst	3.6	Bdnf	2.8	Ighg2b	2.5	Ighg2c	2.2	Shank1	2.0
Syt8	3.5	Wnt10a	2.7	Omd	2.5	Dmrta1	2.2	Dsc2	2.0
Hectd2	3.4	Prkg2	2.7	Sema3c	2.5	Cavin2	2.2	Gpm6b	2.0
Pi15	3.4	Slc24a3	2.7	Epb41l4a	2.5	Grem1	2.2	Slc12a1	2.0
Foxd1	3.4	Ptgs2	2.7	***Gzme***	2.5	Fam83f	2.2	Plut	2.0
Gzmf	3.3	Arsj	2.7	Ngef	2.5	Pak3	2.2	***Gzmb***	2.0
Zic5	3.2	Itgb8	2.7	Trp63	2.4	H19	2.2	Prelp	2.0
Igf2	3.1	Sh3rf3	2.7	Klhdc8a	2.4	Slit2	2.2	***Gbp4***	2.0
Gzmg	3.1	Medag	2.7	Slurp1	2.4	Bmp4	2.1	Rnf165	2.0
Itgbl1	3.1	Tnni2	2.7	Tpsab1	2.4	Grin2d	2.1	Syt12	2.0
Tmem200a	3.1	Cntnap4	2.7	Pdx1	2.4	Ifi202b	2.1	Btc	2.0

[2490]

Dio2	3.0	Sema3a	2.6	Pdgfra	2.4	Kirrel3	2.1	Tssk6	2.0
Gzmd	3.0	Ptgs2os2	2.6	Dkk2	2.4	Podnl1	2.1	Slit3	2.0
Aldh3a1	3.0	Anxa8	2.6	Cavin4	2.4	***Prf1***	2.1	Gcsam	2.0
Scara3	3.0	Rpl39l	2.6	Kcnu1	2.4	Lgals7	2.1	***Il11***	2.0
Il33	2.9	Pcdh19	2.6	Xlr	2.4	***Gbp10***	2.1	Sybu	2.0
Brinp3	2.9	Ltbp1	2.6	Cdh17	2.3	***Gbp8***	2.1	Mrgprf	2.0
Pcdhgb1	2.9	***Gbp2b***	2.5	Ighg3	2.3	Cdyl2	2.1	Irx2	2.0

[2491] 实施例12.8:在施用抗CCR8抗体后同基因肿瘤模型中mRNA表达的改变

[2492] 对于每个同基因肿瘤模型,10只用抗CCR8抗体TPP-14099处理的小鼠和10只用同种型对照处理的小鼠在最终处理后24小时处死。将肿瘤切成小块并浸入4℃的RNAlater中。根据Illumina的Hi-seq方案提取Poly-A mRNA并生成cDNA文库,用于后续的RNA测序。样本测序深度约为4000万150bp长配对末端读数/样本。

[2493] 图63至73显示了用同种型对照(TPP-9809)或抗CCR8抗体(TPP-14099)处理对不同同基因肿瘤模型中不同免疫细胞标志物的mRNA表达水平的影响。治疗增加了炎症标志物lfng、巨噬细胞标志物Ms4a7、Acod1和Mrc1、细胞毒性T细胞标志物Cd8a和Cd8b1、自然杀伤(NK)细胞标志物Ncr1、泛T细胞标志物Cd3e/d/g和B细胞标志物Cd19和Cd22。

[2494] 值得注意的是,发明人在CT26、MBT2和H22肿瘤模型中观察到LTa/b以及Cxcr5及其配体Cxcl13的显著诱导,以及在其他几种模型这些基因包括RM1、Hepa1-6和4T1的总体上调。不受理论的束缚,抗CCR8抗体TPP-14099或TPP-15285对三级淋巴样结构的诱导可能有助于由这些抗体引发的抗肿瘤响应。

[2495] 表12.8.1:T细胞标志物、检查点蛋白、Treg标志物、NK细胞标志物、巨噬细胞标志物、B细胞标志物和干扰素γ与抗CCR8抗体治疗响应的反相关性。

[2496]

		Cd8a	Cd274 [PD-L1]	Pdcd1 [PD-1]	Ctla4	Ccr4	Ccr8	Foxp3	Ncr1	Ms4a7	Fcgr2b	Ifng
CT26	r	-0.693	-0.630	-0.600	-0.654	-0.612	-0.664	-0.531	-0.775	-0.626	-0.496	-0.606
	P值	0.026	0.051	0.067	0.040	0.060	0.036	0.114	0.008	0.053	0.145	0.063
H22	r	-0.791	-0.782	-0.852	-0.804	-0.779	-0.888	-0.828	-0.738	-0.686	-0.710	-0.896
	P值	0.011	0.013	0.004	0.009	0.013	0.001	0.006	0.023	0.041	0.032	0.001

[2497]

[2498] 实施例13:包含抗CCR8抗体的靶向杜缀合物(TTC)的制备

[2499] WO2016096843的全部公开内容通过引用并入本文,特别是关于如本实施例中所述的缀合物的生产。

[2500] 3,2-羟基吡啶酮(3,2-HOPO)螯合剂或任何其他合适的螯合剂与抗体TPP-23411、TPP-21360或描述的任何其他抗CCR8抗体的缀合可如先前在专利申请WO2016096843中所述进行。简而言之,为了激活螯合剂,将3,2-HOPO螯合剂(溶解在DMA,与0.1M MES缓冲液pH5.4以1:1的比率)、NHS和EDC(均溶解在0.1M MES缓冲液pH 5.4)以1/1/3的比率混合。为了与抗体缀合,可以将摩尔比为7.5/7.5/22.5/1(螯合剂/NHS/EDC/mAb)的活化螯合剂与mAb结合。20-60分钟后,用12%v/v 0.3M柠檬酸将pH值调节至5.5以淬灭反应。蛋白质浓度通过HPLC确定,对280nm吸光度处的峰面积进行积分。然后通过切向流过滤(TFF)在恒定体积下将溶液缓冲交换成30mM檬酸盐、50mg/mlx M蔗糖、2mM EDTA、0.5mg/ml pABA、pH 5.5。在渗滤结束时,将溶液排放到配制容器中。该产品由TFF缓冲液(30mM柠檬酸盐、x 50mg/ml M蔗糖、2mM EDTA、0.5mg/ml pABA,pH 5.5)和7%w/v聚山梨酯80配制而成,以获得2.5mg/ml的相应CCR8抗体-螯合剂缀合物(CCR8-ACC)。CCR8-ACC可以通过0.2μm过滤器过滤到无菌小瓶中。

[2501] 如WO2016096843中所述,CCR8-ACC用钍227进行了放射性标记。简言之,将5μl CCR8-ACC与32μl钍227(活性为3.875MBq/ml)和13μl柠檬酸盐缓冲液混合,产生CCR8靶向钍227缀合物(CCR8-TTC),具体活性为10kBq/微克。样品可在室温下孵育60分钟,以便将钍227稳定地标记到3,2-HOPO螯合剂中。样品的等分试样可以通过即时薄层色谱法(iTLC)进行分析。

[2502] 抗休序列

[2503]

SEQ ID	序列
201	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRQLGSWGQGTLVTVSS
202	SYGMH
203	AISGSGGSTYYADSVKG
204	GRQLGS
205	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYGNNNRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL
206	SGSSSNIGSNYVY
207	GNNNRPS
208	AAWDDSLNGWV
209	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCTCTGGCAGCGGCGGCAGCA CATATTACGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCAGACAGCTCGGCTCTTGGGGACAGGGAACACTGGTTACAGTGTCCT CA
210	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTAGCGGCAGCAGCTCCAACATCGGCAGCAACTACGTGTACTGGTATCAG CAGCTGCCCGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACGGCAACAACAACAGACCCAGC GGCGTGCCCGATAGATTCAGCGGCTCTAAGTCTGGCACAAGCGCCAGCCTGGCCATC TCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGACGATTCT CTGAACGGCTGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
211	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRQLGSWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK

[2504]

	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
212	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYGNNNRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
213	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCTCTGGCAGCGGCGGCAGCA CATATTACGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCAGACAGCTCGGCTCTTGGGGACAGGGAACACTGGTTACAGTGTCCT CAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCACAT CTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCCGTGA CCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCT GCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCCTGC CCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACC CTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAG GACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG ACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACA GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG GCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAA CCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCC CTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCA ACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCT CATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACG TGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCC TGAGCCTGAGCCCTGGC
214	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTAGCGGCAGCAGCTCCAACATCGGCAGCAACTACGTGTACTGGTATCAG CAGCTGCCCGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACGGCAACAACAACAGACCCAGC GGCGTGCCCGATAGATTCAGCGGCTCTAAGTCTGGCACAAGCGCCAGCCTGGCCATC TCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGACGATTCT CTGAACGGCTGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTAAA GCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAAG GCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGA AGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCAGA

[2505]

	GCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGT CCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACAG TGGCCCCTACCGAGTGCAGC
215	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGVHWVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRT HYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVTRGAWGQGTLVTVSS
216	DYGVH
217	GVSWNGSRTHYADSVKG
218	RGA
219	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSFNIGSHFVYWYQQLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL
220	SGSSFNIGSHFVY
221	KNNQRPS
222	AAWDDSLNGPV
223	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCGATTATGGCGTGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGAAAAGGACTGGAATGGGTTTCAGGCGTGTCCTGGAACGGCAGCAGAA CCCACTATGCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GTGTGACAAGAGGCGCTTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTCTTCA
224	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTAGCGGCAGCAGCTTCAACATCGGCAGCCACTTCGTGTACTGGTATCAGC AGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACAAGAACAACCAGCGGCCTAGCG GCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTATCT CTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGACGATTCTC TGAACGGCCCTGTTTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTGCTA
225	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGVHWVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRT HYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVTRGAWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
226	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSFNIGSHFVYWYQQLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
227	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCGATTATGGCGTGCACTGGGTCCGAC

[2506]

	AGGCCCCTGGAAAAGGACTGGAATGGGTTTCAGGCGTGTCCTGGAACGGCAGCAGAA CCCACTATGCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GTGTGACAAGAGGCGCTTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCA CCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAA CAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTG GAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAG CGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTG GAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGC TGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAG CCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGT GAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAG AGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCA GGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGC CCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTA CACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT CGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCC CGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTG TACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGC CCTGGC
228	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTAGCGGCAGCAGCTTCAACATCGGCAGCCACTTCGTGTACTGGTATCAGC AGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACAAGAACAACCAGCGGCCTAGCG GCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTATCT CTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGACGATTCTC TGAACGGCCCTGTTTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTGCTAGGCCAGCCTAAAG CCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAAGG CCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAA GGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCAGAG CAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGTC CCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACAGT GGCCCCTACCGAGTGCAGC
229	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGVHWVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRT HYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVTRGAWGQGTLVTVSS
230	DYGVH
231	GVSWNGSRTHYADSVKG
232	RGA

[2507]

233	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSFNIGSHFVYWYQQLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL
234	SGSSFNIGSHFVY
235	KNNQRPS
236	AAWDDSLNGPV
237	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCGATTATGGCGTGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGAAAAGGACTGGAATGGGTTTCAGGCGTGTCCTGGAACGGCAGCAGAA CCCACTATGCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GTGTGACAAGAGGCGCTTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTCTTCA
238	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTAGCGGCAGCAGCTTCAACATCGGCAGCCACTTCGTGTACTGGTATCAGC AGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACAAGAACAACCAGCGGCCTAGCG GCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTATCT CTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGACGATTCTC TGAACGGCCCTGTTTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTGCTA
239	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGVHWVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRT HYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVTRGAWGQGTLVTVSSAKTT APSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFP PKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS ALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVT LTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNS YSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
240	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSFNIGSHFVYWYQQLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTL FPPSSEELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNNKYMASS YLTLTARAWERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS
241	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCGATTATGGCGTGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGAAAAGGACTGGAATGGGTTTCAGGCGTGTCCTGGAACGGCAGCAGAA CCCACTATGCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GTGTGACAAGAGGCGCTTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAAGA CCACCGCCCCCAGCGTGTACCCTCTGGCTCCTGTGTGTGGCGATACCACCGGCAGCTC TGTGACCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGGCTACTTCCCTGAGCCAGTGACCCTGACCTGG AACAGCGGCTCTCTGTCTAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCGACC TGTACACCCTGAGCAGCAGCGTGACCGTGACCAGCAGCACATGGCCCAGCCAGAGCA

[2508]

	TCACCTGTAACGTGGCCCACCCTGCCAGCTCCACCAAGGTGGACAAGAAGATCGAGC CCAGAGGCCCCACCATCAAGCCTTGCCCCCCTTGCAAATGCCCTGCCCCCAATCTGCT GGGCGGACCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCCAAGATCAAGGACGTGCTGATGATCAGC CTGAGCCCCATCGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCGAGGACGACCCCGATGTG CAGATCAGTTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTGCACACCGCCCAGACCCAGACACAC AGAGAGGACTACAACAGCACCCTGAGAGTGGTGTCCGCCCTGCCCATCCAGCACCAG GATTGGATGAGCGGCAAAGAGTTCAAGTGCAAAGTGAACAACAAGGACCTGCCAGC CCCCATCGAGCGGACCATCTCTAAGCCTAAGGGCAGCGTGCGGGCTCCCCAGGTGTA CGTGCTGCCTCCTCCAGAGGAAGAGATGACCAAGAAACAAGTGACACTGACATGCAT GGTCACCGACTTCATGCCCGAGGACATCTACGTGGAATGGACCAACAACGGCAAGAC CGAGCTGAACTACAAGAACACCGAGCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTACTTCAT GTACAGCAAGCTGCGGGTGGAAAAGAAAAACTGGGTGGAACGGAACAGCTACAGCT GCAGCGTGGTGCACGAGGGCCTGCACAATCACCACACCACCAAGAGCTTCAGCCGGA CCCCTGGCAAG
242	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTAGCGGCAGCAGCTTCAACATCGGCAGCCACTTCGTGTACTGGTATCAGC AGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACAAGAACAACCAGCGGCCTAGCG GCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTATCT CTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGACGATTCTC TGAACGGCCCTGTTTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTGCTAGGCCAGCCCAAGA GCAGCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGGAAACAAACAAGG CCACCCTCGTGTGCACCATCACCGACTTCTACCCCGGCGTCGTGACCGTGGACTGGAA GGTGGACGGCACCCCAGTGACCCAGGGCATGGAAACCACCCAGCCCAGCAAGCAGA GCAACAACAAGTACATGGCCAGCAGCTACCTGACCCTGACCGCCAGAGCCTGGGAGA GACACAGCTCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCCACACCGTGGAAAAGAGCC TGAGCAGAGCCGACTGCAGC
243	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRQLGSWGQGTLVTVSS
244	SYGMH
245	AISGSGGSTYYADSVKG
246	GRQLGS
247	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYGNNNRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL
248	SGSSSNIGSNYVY
249	GNNNRPS
250	AAWDDSLNGWV
251	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCTCTGGCAGCGGCGGCAGCA

[2509]

	CATATTACGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCAGACAGCTCGGCTCTTGGGGACAGGGAACACTGGTTACAGTGTCCT CA
252	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTAGCGGCAGCAGCTCCAACATCGGCAGCAACTACGTGTACTGGTATCAG CAGCTGCCCGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACGGCAACAACAACAGACCCAGC GGCGTGCCCGATAGATTCAGCGGCTCTAAGTCTGGCACAAGCGCCAGCCTGGCCATC TCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGACGATTCT CTGAACGGCTGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
253	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRQLGSWGQGTLVTVSSAK TTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLY TLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRV VSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQ VTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVER NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
254	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYGNNNRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTL FPPSSEELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNNKYMASS YLTLTARAWERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS
255	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCTCTGGCAGCGGCGGCAGCA CATATTACGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCAGACAGCTCGGCTCTTGGGGACAGGGAACACTGGTTACAGTGTCCT CAGCCAAGACCACCGCCCCCAGCGTGTACCCTCTGGCTCCTGTGTGTGGCGATACCAC CGGCAGCTCTGTGACCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGGCTACTTCCCTGAGCCAGTGACC CTGACCTGGAACAGCGGCTCTCTGTCTAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGC AGAGCGACCTGTACACCCTGAGCAGCAGCGTGACCGTGACCAGCAGCACATGGCCCA GCCAGAGCATCACCTGTAACGTGGCCCACCCTGCCAGCTCCACCAAGGTGGACAAGA AGATCGAGCCCAGAGGCCCCACCATCAAGCCTTGCCCCCCTTGCAAATGCCCTGCCCC CAATCTGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCCAAGATCAAGGACGTGCTG ATGATCAGCCTGAGCCCCATCGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCGAGGACGAC CCCGATGTGCAGATCAGTTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTGCACACCGCCCAGACC CAGACACACAGAGAGGACTACAACAGCACCCTGAGAGTGGTGTCCGCCCTGCCCATC CAGCACCAGGATTGGATGAGCGGCAAAGAGTTCAAGTGCAAAGTGAACAACAAGGA

		CCTGCCAGCCCCCATCGAGCGGACCATCTCTAAGCCTAAGGGCAGCGTGCGGGCTCC CCAGGTGTACGTGCTGCCTCCTCCAGAGGAAGAGATGACCAAGAAACAAGTGACACT GACATGCATGGTCACCGACTTCATGCCCGAGGACATCTACGTGGAATGGACCAACAA CGGCAAGACCGAGCTGAACTACAAGAACACCGAGCCCGTGCTGGACAGCGACGGCA GCTACTTCATGTACAGCAAGCTGCGGGTGGAAAAGAAAAACTGGGTGGAACGGAAC AGCTACAGCTGCAGCGTGGTGCACGAGGGCCTGCACAATCACCACACCACCAAGAGC TTCAGCCGGACCCCTGGCAAG
	256	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTAGCGGCAGCAGCTCCAACATCGGCAGCAACTACGTGTACTGGTATCAG CAGCTGCCCGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACGGCAACAACAACAGACCCAGC GGCGTGCCCGATAGATTCAGCGGCTCTAAGTCTGGCACAAGCGCCAGCCTGGCCATC TCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGACGATTCT CTGAACGGCTGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCCAAG AGCAGCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGGAAACAAACAAG GCCACCCTCGTGTGCACCATCACCGACTTCTACCCCGGCGTCGTGACCGTGGACTGGA AGGTGGACGGCACCCCAGTGACCCAGGGCATGGAAACCACCCAGCCCAGCAAGCAG AGCAACAACAAGTACATGGCCAGCAGCTACCTGACCCTGACCGCCAGAGCCTGGGAG AGACACAGCTCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCCACACCGTGGAAAAGAGC CTGAGCAGAGCCGACTGCAGC
[2510]	**257**	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSGVSWAGSRT HYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAAAGTRGFDYWGQGTLVT VSS
	258	SYSMN
	259	GVSWAGSRTHYADSVKG
	260	AAAGTRGFDY
	261	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSHIVNWYQQLPGTAPKLLIYGNTNRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSYTSISTLVFGGGTKLTVL
	262	SGSSSNIGSHIVN
	263	GNTNRPS
	264	SSYTSISTLV
	265	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTACAGCATGAACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTTTCAGGCGTGTCCTGGGCCGGCAGCAGAA CCCACTATGCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGCTGCCGCCGGAACCAGAGGCTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGG TCACCGTTTCTTCA
	266	AGCTACAGCATGAAC
	267	GGCGTGTCCTGGGCCGGCAGCAGAACCCACTATGCCGACAGCGTGAAGGGC

[2511]

268	GCTGCCGCCGGAACCAGAGGCTTTGATTAT
269	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTAGCGGCAGCAGCTCCAATATCGGCAGCCACATCGTGAACTGGTATCAG CAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACGGCAACACCAACAGACCCAGC GGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCTCTAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTATC TCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCAGCAGCTACACCAGCATC AGCACCCTGGTTTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTGCTA
270	AGCGGCAGCAGCTCCAATATCGGCAGCCACATCGTGAAC
271	GGCAACACCAACAGACCCAGC
272	AGCAGCTACACCAGCATCAGCACCCTGGTT
273	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSGVSWAGSRT HYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAAAGTRGFDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
274	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSHIVNWYQQLPGTAPKLLIYGNTNRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSYTSISTLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPS SEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
275	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYAMHWVRQAPGKGLEWVSLISWDGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGIGRRPGLEYWGQGTLVTV SS
276	SYAMH
277	LISWDGGSTYYADSVKG
278	GGIGRRPGLEY
279	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQTWGTGIRVFGGGTKLTVL
280	SGSSSNIGNNYVS
281	GNSNRPS
282	QTWGTGIRV
283	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGGAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTCTTATTAGTTGGGATGGTGGTAGCA CCTACTATGCAGACTCTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACT GTGCGAGAGGGGGTATAGGGCGTCGTCCTGGGCTTGAGTACTGGGGCCAAGGTACCC

[2512]

	TGGTCACCGTGAGTTCA
284	AGCTATGCTATGCAC
285	CTTATTAGTTGGGATGGTGGTAGCACCTACTATGCAGACTCTGTGAAGGGT
286	GGGGGTATAGGGCGTCGTCCTGGGCTTGAGTAC
287	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACC ATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGAAATAATTATGTTTCCTGGTATCAGC AGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAG GGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAG TGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTCAGACCTGGGGCACTGGCATT CGGGTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
288	TCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGAAATAATTATGTTTCC
289	GGTAACAGCAATCGGCCCTCA
290	CAGACCTGGGGCACTGGCATTCGGGTG
291	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYAMHWVRQAPGKGLEWVSLISWDGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGIGRRPGLEYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
292	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQTWGTGIRVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
293	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANSYA TAYAASVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRPLDSWGQGTLVTVSS
294	SYAMS
295	RIRSKANSYATAYAASVKG
296	PLDS
297	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRSSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDNSLSASVFGGGTKLTVL
298	SGSSSNIGNNAVN
299	RNNQRSS
300	QSYDNSLSASV
301	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATTAGAAGCAAAGCTAACAGTT

[2513]

	ACGCGACAGCATATGCTGCGTCGGTGAAAGGCAGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGT ATTACTGTACGAGGCCCTTGGACTCCTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTGAGTTC A
302	AGCTATGCCATGAGC
303	CGTATTAGAAGCAAAGCTAACAGTTACGCGACAGCATATGCTGCGTCGGTGAAAGGC
304	CCCTTGGACTCC
305	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACC ATCTCCTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAATAATGCTGTAAACTGGTATCAGC AGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGAAATAATCAGCGGTCCTCAG GGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAG TGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAACAGCCTG AGTGCTTCGGTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
306	TCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAATAATGCTGTAAAC
307	AGAAATAATCAGCGGTCCTCA
308	CAGTCCTATGACAACAGCCTGAGTGCTTCGGTG
309	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANSYA TAYAASVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRPLDSWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
310	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRSSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDNSLSASVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
311	EVQLLESGGGLLQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVAVISYDGRNK YSADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLPYGYWGQGTLVTVSS
312	NAWMS
313	VISYDGRNKYSADSVKG
314	GLPYGY
315	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLKALVFGGGTKLTVL
316	SGSSSNIGSNTVN
317	RNNQRPS
318	AAWDDSLKALV

319	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGTTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGAAATA AATACTCTGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACT GTGCGAGGGGCCTCCCTTATGGCTACTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTGAGTTC A
320	AACGCCTGGATGAGC
321	GTTATATCATATGATGGAAGAAATAAATACTCTGCAGACTCCGTGAAGGGC
322	GGCCTCCCTTATGGCTAC
323	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACC ATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAACTGGTATCAGC AGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAG GGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAG TGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCTGCATGGGATGACAGTCT GAAGGCTCTGGTATTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
324	TCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAAC
325	AGGAATAATCAGCGGCCCTCA
326	GCTGCATGGGATGACAGTCTGAAGGCTCTGGTA
327	EVQLLESGGGLLQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVAVISYDGRNK YSADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLPYGYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
328	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLKALVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
329	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRTYSGHYGPYFDNWGQGTL VTVSS
330	NAWMS
331	GINWNGGSTGYADSVKG
332	TYSGHYGPYFDN
333	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSHTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL

[2514]

334	SGSSSNIGSHTVN
335	RNNQRPS
336	AAWDDSLNGWV
337	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGGAATGGTGGTAGCA CAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACT GTGTTAGGACGTATAGTGGGCACTACGGACCCTACTTTGACAACTGGGGCCAAGGTA CCCTGGTCACCGTGAGTTCA
338	AACGCCTGGATGAGC
339	GGTATTAATTGGAATGGTGGTAGCACAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGC
340	ACGTATAGTGGGCACTACGGACCCTACTTTGACAAC
341	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACC ATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTCATACTGTAAACTGGTATCAGC AGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAG GGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAG TGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCT GAATGGTTGGGTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
342	TCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTCATACTGTAAAC
343	AGGAATAATCAGCGGCCCTCA
344	GCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTTGGGTG
345	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRTYSGHYGPYFDNWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
346	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSHTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
347	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVTYWMTWVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRT HYVDSVKRRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYSGYPDYYGMDVWGQGT LVTVSS
348	TYWMT
349	GVSWNGSRTHYVDSVKR

[2515]

[2516]

350	YSGYPDYYGMDV
351	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSWSNIGNDNVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDRSLSGSVFGGGTKLTVL
352	SGSWSNIGNDNVY
353	RNNQRPS
354	QSYDRSLSGSV
355	GAGGTGCAACTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGTTACATATTGGATGACCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTATCGGGTGTTAGTTGGAATGGCAGTAGGA CGCACTATGTGGACTCCGTGAAGCGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACT GTGCGAGATATAGTGGCTACCCTGACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGTA CCCTGGTCACCGTGAGTTCA
356	ACATATTGGATGACC
357	GGTGTTAGTTGGAATGGCAGTAGGACGCACTATGTGGACTCCGTGAAGCGC
358	TATAGTGGCTACCCTGACTACTACGGTATGGACGTC
359	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACC ATCTCTTGTTCTGGAAGCTGGTCCAACATCGGAAATGATAATGTATACTGGTATCAGC AGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAG GGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAG TGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCTTATGACAGGAGCCTG AGTGGTTCGGTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
360	TCTGGAAGCTGGTCCAACATCGGAAATGATAATGTATAC
361	AGGAATAATCAGCGGCCCTCA
362	CAGTCTTATGACAGGAGCCTGAGTGGTTCGGTG
363	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVTYWMTWVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRT HYVDSVKRRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYSGYPDYYGMDVWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
364	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSWSNIGNDNVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDRSLSGSVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
365	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRT RYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGSYNSGWYAVSWGQGTLV

[2517]

	TVSS
366	SYGMH
367	GVSWNGSRTRYADSVKG
368	GSYNSGWYAVS
369	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSYPVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSYSVTDNLIFGGGTKLTVL
370	SGSSSNIGSYPVN
371	RNNQRPS
372	SSYSVTDNLI
373	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTATCGGGTGTTAGTTGGAATGGCAGTAGGA CGCGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACT GTACTAGAGGGTCATATAATAGTGGCTGGTACGCGGTCTCCTGGGGCCAAGGTACCC TGGTCACCGTGAGTTCA
374	AGCTATGGCATGCAC
375	GGTGTTAGTTGGAATGGCAGTAGGACGCGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGC
376	GGGTCATATAATAGTGGCTGGTACGCGGTCTCC
377	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCTGGGCAGAGGGTCACC ATCTCTTGTTCTGGAAGCAGTTCCAACATCGGGAGTTATCCTGTAAACTGGTATCAGC AGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAG GGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAG TGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATTCTGTCACCGAC AATTTGATATTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
378	TCTGGAAGCAGTTCCAACATCGGGAGTTATCCTGTAAAC
379	AGGAATAATCAGCGGCCCTCA
380	AGCTCATATTCTGTCACCGACAATTTGATA
381	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRT RYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGSYNSGWYAVSWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
382	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSYPVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSYSVTDNLIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL

[2518]

	TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
383	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYRMTWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRFDTRGFYGFDYWGQGT LVTVSS
384	NYRMT
385	GINWNGGSTGYADSVKG
386	GRFDTRGFYGFDY
387	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYSHNQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSAWDSSLSAWVFGGGTKLTVL
388	TGSSSNIGAGYDVH
389	SHNQRPS
390	SAWDSSLSAWV
391	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAATTATAGGATGACCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGGAATGGTGGTAGCA CAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACT GTGCCAGAGGGCGCTTTGATACTAGGGGTTTTTACGGCTTTGACTACTGGGGCCAAG GTACCCTGGTCACCGTGAGTTCA
392	AATTATAGGATGACC
393	GGTATTAATTGGAATGGTGGTAGCACAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGC
394	GGGCGCTTTGATACTAGGGGTTTTTACGGCTTTGACTAC
395	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACC ATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTATC AGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTCATAATCAGCGGCCCTC AGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATC AGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCTCAGCATGGGACAGCAGC CTCAGTGCTTGGGTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
396	ACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACAC
397	AGTCATAATCAGCGGCCCTCA
398	TCAGCATGGGACAGCAGCCTCAGTGCTTGGGTG
399	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYRMTWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRFDTRGFYGFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[2519]

400	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYSHNQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSAWDSSLSAWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
401	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIRWNSGSKG YAGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRSGNYYVGYHGMDVWGQGT LVTVSS
402	SYAMS
403	GIRWNSGSKGYAGSVKG
404	SGNYYVGYHGMDV
405	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGNSNIGTYFVSWYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCETWDSNTRVFGGGTKLTVL
406	SGGNSNIGTYFVS
407	TNNQRPS
408	ETWDSNTRV
409	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGAC AGGCTCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTGTCCGGCATCAGATGGAACAGCGGCTCTA AGGGCTATGCCGGCTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GTGTGCGGAGCGGCAATTACTACGTGGGCTACCACGGCATGGATGTGTGGGGACAGG GAACCCTGGTTACCGTTTCTTCA
410	AGCTACGCCATGAGC
411	GGCATCAGATGGAACAGCGGCTCTAAGGGCTATGCCGGCTCTGTGAAGGGC
412	AGCGGCAATTACTACGTGGGCTACCACGGCATGGATGTG
413	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTAGCGGCGGCAACAGCAACATCGGCACCTACTTCGTGTCCTGGTATCAG CAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACCAGCGGCCTAGC GGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTATC TCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCGAGACATGGGACAGCAAC ACCAGAGTGTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTGCTA
414	AGCGGCGGCAACAGCAACATCGGCACCTACTTCGTGTCC
415	ACCAACAACCAGCGGCCTAGC
416	GAGACATGGGACAGCAACACCAGAGTG
417	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIRWNSGSKG YAGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRSGNYYVGYHGMDVWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP

	REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
418	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGNSNIGTYFVSWYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCETWDSNTRVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
419	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
420	HYGMH
421	GINWNGGSTGYADSVKG
422	GHHSGYDGRFFDY
423	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
424	TGSSSNIGAGYNVH
425	TNNRRPS
426	AAWDASLSGWV
427	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
428	CACTATGGCATGCAC
429	GGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
430	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
431	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
432	ACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
433	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
434	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
435	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST

[2520]

[2521]

	GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
436	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
437	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTYTGNYGPYFDYWGQGTL VTVSS
438	NAWMS
439	GINWNGGSTGYADSVKG
440	TYTGNYGPYFDY
441	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLRGWVFGGGTKLTVL
442	TGSSSNIGAGYDVH
443	KNNQRPS
444	AAWDDSLRGWV
445	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAATGCCTGGATGAGCTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGAAAAGGCCTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GTGCCAGAACCTACACCGGCAACTACGGCCCCTACTTCGATTATTGGGGCCAGGGCA CACTGGTCACCGTTTCTTCA
446	AATGCCTGGATGAGC
447	GGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
448	ACCTACACCGGCAACTACGGCCCCTACTTCGATTAT
449	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTATGACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACAAGAACAACCAGCGGCCT AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGAT TCTCTGAGAGGCTGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
450	ACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTATGACGTGCAC

[2522]

451	AAGAACAACCAGCGGCCTAGC
452	GCCGCCTGGGATGATTCTCTGAGAGGCTGGGTT
453	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTYTGNYGPYFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
454	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLRGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
455	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAWMSWVRQAPGKGLEWVSGISWSGGSTG YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTYSGHYGPYFDYWGQGTLV TVSS
456	SAWMS
457	GISWSGGSTGYADSVKG
458	TYSGHYGPYFDY
459	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSHTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL
460	SGSSSNIGSHTVN
461	RNNQRPS
462	AAWDDSLNGWV
463	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACATTTTCTAGCGCCTGGATGAGCTGGGTCCGAC AGGCTCCTGGAAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGGCATCTCTTGGAGCGGCGGCTCTA CAGGCTATGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GTGCCAGAACATACAGCGGCCACTACGGCCCCTACTTCGATTATTGGGGCCAGGGCA CACTGGTCACCGTTTCTTCA
464	AGCGCCTGGATGAGC
465	GGCATCTCTTGGAGCGGCGGCTCTACAGGCTATGCCGATTCTGTGAAGGGC
466	ACATACAGCGGCCACTACGGCCCCTACTTCGATTAT
467	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACC ATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTCATACTGTAAACTGGTATCAGC AGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAG GGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAG

[2523]

	TGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCT GAATGGTTGGGTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
468	TCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTCATACTGTAAAC
469	AGGAATAATCAGCGGCCCTCA
470	GCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTTGGGTG
471	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAWMSWVRQAPGKGLEWVSGISWSGGSTG YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTYSGHYGPYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
472	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSHTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
473	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAIKWGGGSH GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGKDGRFFDYWGQGT LVTVSS
474	SYGMH
475	AIKWGGGSHGYADSVKG
476	GHHSGKDGRFFDY
477	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
478	TGSSSNIGAGYNVH
479	TNNRRPS
480	AAWDASLSGWV
481	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATTAAGTGGGGCGGAGGCTCTC ACGGCTATGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACTCTGGCAAGGACGGCAGATTCTTCGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
482	AGCTATGGCATGCAC
483	GCCATTAAGTGGGGCGGAGGCTCTCACGGCTATGCCGATTCTGTGAAGGGC
484	GGCCACCACTCTGGCAAGGACGGCAGATTCTTCGACTAT

[2524]

485	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
486	ACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
487	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
488	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
489	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAIKWGGGSH GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGKDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
490	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
491	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAIKWGGGSH GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHKGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
492	SYGMH
493	AIKWGGGSHGYADSVKG
494	GHHKGYDGRFFDY
495	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
496	TGSSSNIGAGYNVH
497	TNNRRPS
498	AAWDASLSGWV
499	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATTAAGTGGGGCGGAGGCTCTC ACGGCTATGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAAGGGCTACGACGGCAGATTCTTCGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA

[2525]

500	AGCTATGGCATGCAC
501	GCCATTAAGTGGGGCGGAGGCTCTCACGGCTATGCCGATTCTGTGAAGGGC
502	GGCCACCACAAGGGCTACGACGGCAGATTCTTCGACTAT
503	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
504	ACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
505	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
506	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
507	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAIKWGGGSH GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHKGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
508	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
509	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAIKWGGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGKDGRFFDYWGQGT LVTVSS
510	SYGMH
511	AIKWGGGSTGYADSVKG
512	GHHSGKDGRFFDY
513	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
514	TGSSSNIGAGYNVH
515	TNNRRPS
516	AAWDASLSGWV
517	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATTAAGTGGGGCGGAGGCTCTA CAGGCTACGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA

[2526]

	ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACTCTGGCAAGGACGGCAGATTCTTCGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
518	AGCTATGGCATGCAC
519	GCCATTAAGTGGGGCGGAGGCTCTACAGGCTACGCCGATTCTGTGAAGGGC
520	GGCCACCACTCTGGCAAGGACGGCAGATTCTTCGACTAT
521	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
522	ACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
523	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
524	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
525	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAIKWGGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGKDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
526	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
527	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAWMSWVRQAPGKGLEWVSGISWSGGSTG YALSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTYSGHYGPFFDYWGQGTLVT VSS
528	SAWMS
529	GISWSGGSTGYALSVKG
530	TYSGHYGPFFDY
531	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSHTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL
532	SGSSSNIGSHTVN
533	RNNQRPS
534	AAWDDSLNGWV

535	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACATTTTCTAGCGCCTGGATGAGCTGGGTCCGAC AGGCTCCTGGAAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGGCATCTCTTGGAGCGGCGGCTCTA CAGGATATGCCCTGTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GTGCCAGAACATACAGCGGCCACTACGGCCCTTTCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCA CACTGGTCACAGTCTCTTCA
536	AGCGCCTGGATGAGC
537	GGCATCTCTTGGAGCGGCGGCTCTACAGGATATGCCCTGTCTGTGAAGGGC
538	ACATACAGCGGCCACTACGGCCCTTTCTTCGACTAT
539	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACC ATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTCATACTGTAAACTGGTATCAGC AGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAG GGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAG TGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCT GAATGGTTGGGTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
540	TCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTCATACTGTAAAC
541	AGGAATAATCAGCGGCCCTCA
542	GCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTTGGGTG
543	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAWMSWVRQAPGKGLEWVSGISWSGGSTG YALSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTYSGHYGPFFDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
544	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSHTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
545	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAWMSWVRQAPGKGLEWVSGISWSGGRTG YALSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTYSGHYGPYFDYWGQGTLV TVSS
546	SAWMS
547	GISWSGGRTGYALSVKG
548	TYSGHYGPYFDY
549	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSHTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL

[2527]

550	SGSSSNIGSHTVN
551	RNNQRPS
552	AAWDDSLNGWV
553	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACATTTTCTAGCGCCTGGATGAGCTGGGTCCGAC AGGCTCCTGGAAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGGCATCTCTTGGAGCGGCGGCAGAA CAGGATATGCCCTGTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GTGCCAGAACATACAGCGGCCACTACGGCCCCTACTTCGATTATTGGGGCCAGGGCA CACTGGTCACCGTTTCTTCA
554	AGCGCCTGGATGAGC
555	GGCATCTCTTGGAGCGGCGGCAGAACAGGATATGCCCTGTCTGTGAAGGGC
556	ACATACAGCGGCCACTACGGCCCCTACTTCGATTAT
557	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACC ATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTCATACTGTAAACTGGTATCAGC AGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAG GGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAG TGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCT GAATGGTTGGGTGTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
558	TCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTCATACTGTAAAC
559	AGGAATAATCAGCGGCCCTCA
560	GCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTTGGGTG
561	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAWMSWVRQAPGKGLEWVSGISWSGGRTG YALSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTYSGHYGPYFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
562	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSHTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
563	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIRWNNGSKG YAGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGNYYYGYHGMDVWGQGT LVTVSS
564	SYAMS
565	GIRWNNGSKGYAGSVKG

[2528]

[2529]

566	SGNYYYGYHGMDV
567	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGNSNIGTYFVSWYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCETWDSNTRVFGGGTKLTVL
568	SGGNSNIGTYFVS
569	TNNQRPS
570	ETWDSNTRV
571	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGAC AGGCTCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTGTCCGGCATCAGATGGAACAACGGCAGCA AGGGCTATGCCGGCTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GTGCCAGAAGCGGCAACTACTACTACGGCTACCACGGCATGGATGTGTGGGGCCAGG GAACACTGGTTACCGTTTCTTCA
572	AGCTACGCCATGAGC
573	GGCATCAGATGGAACAACGGCAGCAAGGGCTATGCCGGCTCTGTGAAGGGC
574	AGCGGCAACTACTACTACGGCTACCACGGCATGGATGTG
575	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTAGCGGCGGCAACAGCAACATCGGCACCTACTTCGTGTCCTGGTATCAG CAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACCAGCGGCCTAGC GGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTATC TCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCGAGACATGGGACAGCAAC ACCAGAGTGTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTGCTA
576	AGCGGCGGCAACAGCAACATCGGCACCTACTTCGTGTCC
577	ACCAACAACCAGCGGCCTAGC
578	GAGACATGGGACAGCAACACCAGAGTG
579	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIRWNNGSKG YAGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGNYYYGYHGMDVWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
580	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGNSNIGTYFVSWYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCETWDSNTRVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
581	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIRWNNGSKG YAGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGNEYYGYHGMDVWGQGT

	LVTVSS
582	SYAMS
583	GIRWNNGSKGYAGSVKG
584	SGNEYYGYHGMDV
585	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGNSNIGTYFVSWYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCETWDSNTRVFGGGTKLTVL
586	SGGNSNIGTYFVS
587	TNNQRPS
588	ETWDSNTRV
589	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGAC AGGCTCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTGTCCGGCATCAGATGGAACAACGGCAGCA AGGGCTATGCCGGCTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GTGCCAGAAGCGGCAACGAGTACTACGGCTACCACGGCATGGATGTGTGGGGCCAGG GAACACTGGTTACCGTTTCTTCA
590	AGCTACGCCATGAGC
591	GGCATCAGATGGAACAACGGCAGCAAGGGCTATGCCGGCTCTGTGAAGGGC
592	AGCGGCAACGAGTACTACGGCTACCACGGCATGGATGTG
593	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTAGCGGCGGCAACAGCAACATCGGCACCTACTTCGTGTCCTGGTATCAG CAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACCAGCGGCCTAGC GGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTATC TCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCGAGACATGGGACAGCAAC ACCAGAGTGTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTGCTA
594	AGCGGCGGCAACAGCAACATCGGCACCTACTTCGTGTCC
595	ACCAACAACCAGCGGCCTAGC
596	GAGACATGGGACAGCAACACCAGAGTG
597	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIRWNNGSKG YAGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGNEYYGYHGMDVWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
598	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGNSNIGTYFVSWYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCETWDSNTRVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL

[2530]

	TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
599	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
600	SYGMH
601	AINWNGGSTGYADSVKG
602	GHHSGYDGRFFDY
603	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
604	TGSSSNIGAGYNVH
605	TNNRRPS
606	AAWDASLSGWV
607	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
608	AGCTATGGCATGCAC
609	GCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
610	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
611	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
612	ACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
613	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
614	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
615	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[2531]

[2532]

616	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
617	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
618	SYGMH
619	AINWNGGSTGYADSVKG
620	GHHSGYDGRFFDY
621	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
622	TGSSSNIGAGYNVH
623	TNNRRPS
624	AAWDASLSGWV
625	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGATTGGTTCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGA CTGTCTTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGGAATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGATTGGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAACGGCGGCTCTA CCGGCTACGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACTCCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCTAGAGGCCACCACTCTGGCTACGACGGCAGATTCTTCGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
626	AGCTACGGAATGCAC
627	GCCATCAACTGGAACGGCGGCTCTACCGGCTACGCCGATTCTGTGAAGGGC
628	GGCCACCACTCTGGCTACGACGGCAGATTCTTCGACTAT
629	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
630	ACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
631	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
632	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
633	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP

		REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	634	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	660	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
	661	SYGMH
	662	GINWNGGSTGYADSVKG
	663	GHHSGYDGRFFDY
	664	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
	665	TGSSSNIGAGYNVH
	666	TNNRRPS
	667	AAWDASLSGWV
[2533]	**668**	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
	669	AGCTATGGCATGCAC
	670	GGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
	671	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
	672	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
	673	ACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
	674	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
	675	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
	676	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST

[2534]

	GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
677	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
678	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCAAG
679	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA

	TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTAA AGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAA GGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGG AAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCAG AGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAG TCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACA GTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
680	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
681	SYGMH
682	AINWNGGSTGYADSVKG
683	GHHSGYDGRFFDY
684	QSVLTQPPSASGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
685	TGSSSNIGAGYNVH
686	TNNRRPS
687	AAWDASLSGWV
688	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
689	AGCTATGGCATGCAC
690	GCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
691	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
692	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGCTAGCGGAGCCCCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
693	ACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
694	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
695	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
696	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST

[2535]

[2536]

	GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
697	QSVLTQPPSASGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
698	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCAAG
699	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGCTAGCGGAGCCCCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT

[2537]

	ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTA AAGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACA AGGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCA GAGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAA GTCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGAC AGTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
700	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
701	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTA AAGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACA

[2538]

	AGGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCA GAGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAA GTCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGAC AGTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
702	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
703	HYGMH
704	GINWNGGSTGYADSVKG
705	GHHSGYDGRFFDY
706	QSVLTQPPSVSGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
707	TGSSSNIGAGYNVH
708	TNNRRPS
709	AAWDASLSGWV
710	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
711	CACTATGGCATGCAC
712	GGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
713	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
714	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCCGTGTCTGGCACACCTGGCCAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCTCTAAGAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
715	ACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
716	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
717	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
718	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP

[2539]

	ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
719	QSVLTQPPSVSGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
720	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
721	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCCGTGTCTGGCACACCTGGCCAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCTCTAAGAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTAA AGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAA

[2540]

	GGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGG AAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCAG AGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAG TCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACA GTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
722	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
723	HYGMH
724	GINWNGGSTGYADSVKG
725	GHHSGYDGRFFDY
726	QSVLTQPPSASGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
727	TGSSSNIGAGYNVH
728	TNNRRPS
729	AAWDASLSGWV
730	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
731	CACTATGGCATGCAC
732	GGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
733	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
734	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGCTAGCGGAGCCCCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
735	ACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
736	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
737	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
738	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP

[2541]

	ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
739	QSVLTQPPSASGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
740	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
741	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGCTAGCGGAGCCCCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTA AAGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACA

[2542]

	AGGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCA GAGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAA GTCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGAC AGTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
742	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
743	HYGMH
744	GINWNGGSTGYADSVKG
745	GHHSGYDGRFFDY
746	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
747	TGSSSNIGAGYNVH
748	TNNRRPS
749	AAWDASLSGWV
750	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
751	CACTATGGCATGCAC
752	GGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
753	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
754	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
755	ACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
756	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
757	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
758	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP

[2543]

	ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
759	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
760	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
761	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTAA AGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAA

[2544]

	GGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGG AAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCAG AGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAG TCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACA GTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
762	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
763	SYGMH
764	GINWNGGSTGYADSVKG
765	GHHSGYDGRFFDY
766	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
767	TGSSSNIGAGYNVH
768	TNNRRPS
769	AAWDASLSGWV
770	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
771	AGCTATGGCATGCAC
772	GGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
773	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
774	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
775	ACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
776	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
777	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
778	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP

[2545]

	ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
779	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
780	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
781	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTA AAGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACA

[2546]

	AGGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCA GAGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAA GTCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGAC AGTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
782	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
783	HYGMH
784	AINWNGGSTGYADSVKG
785	GHHSGYDGRFFDY
786	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
787	TGSSSNIGAGYNVH
788	TNNRRPS
789	AAWDASLSGWV
790	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
791	CACTATGGCATGCAC
792	GCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
793	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
794	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
795	ACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
796	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
797	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
798	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP

[2547]

	ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
799	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
800	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
801	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTA AAGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACA

[2548]

	AGGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCA GAGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAA GTCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGAC AGTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
802	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
803	SYGMH
804	AINWNGGSTGYADSVKG
805	GHHSGYDGRFFDY
806	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
807	TGSSSNIGAGYNVH
808	TNNRRPS
809	AAWDASLSGWV
810	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
811	AGCTATGGCATGCAC
812	GCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
813	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
814	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
815	ACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
816	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
817	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
818	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP

[2549]

	ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
819	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
820	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
821	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTA AAGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACA

[2550]

	AGGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCA GAGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAA GTCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGAC AGTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
822	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
823	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTAA AGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAA GGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGG AAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCAG AGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAG

[2551]

	TCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACA GTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
824	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCAAG
825	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTAA AGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAA GGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGG AAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCAG AGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAG TCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACA GTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
826	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST

	GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
827	SYGMH
828	AINWNGGSTGYADSVKG
829	GHHSGYDGRFFDY
830	QSVLTQPPSVSGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
831	TGSSSNIGAGYNVH
832	TNNRRPS
833	AAWDASLSGWV
834	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
835	AGCTATGGCATGCAC
836	GCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
837	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
838	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCCGTGTCTGGCACACCTGGCCAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCTCTAAGAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
839	ACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
840	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
841	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
842	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
843	QSVLTQPPSVSGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV

[2552]

[2553]

	TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
844	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
845	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCCGTGTCTGGCACACCTGGCCAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCTCTAAGAGCGGCACCAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTAA AGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAA GGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGG AAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCAG AGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAG TCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACA GTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
846	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST

	GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
847	SYGMH
848	AINWNGGSTGYADSVKG
849	GHHSGYDGRFFDY
850	QSVLTQPPSASGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
851	TGSSSNIGAGYNVH
852	TNNRRPS
853	AAWDASLSGWV
854	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
855	AGCTATGGCATGCAC
856	GCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
857	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
858	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGCTAGCGGAGCCCCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
859	ACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
860	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
861	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
862	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
863	QSVLTQPPSASGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV

[2554]

[2555]

	TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
864	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
865	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGCTAGCGGAGCCCCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTA AAGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACA AGGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCA GAGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAA GTCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGAC AGTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
866	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST

	GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
867	SYGMH
868	GINWNGGSTGYADSVKG
869	GHHSGYDGRFFDY
870	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
871	TGSSSNIGAGYNVH
872	TNNRRPS
873	AAWDASLSGWV
874	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
875	AGCTATGGCATGCAC
876	GGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
[2556] **877**	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
878	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
879	ACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
880	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
881	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
882	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
883	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV

[2557]

	TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
884	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
885	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTAA AGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAA GGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGG AAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCAG AGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAG TCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACA GTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
886	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST

	GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
887	HYGMH
888	AINWNGGSTGYADSVKG
889	GHHSGYDGRFFDY
890	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
891	TGSSSNIGAGYNVH
892	TNNRRPS
893	AAWDASLSGWV
894	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
895	CACTATGGCATGCAC
896	GCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
[2558] **897**	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
898	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
899	ACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
900	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
901	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
902	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
903	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV

[2559]

	TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
904	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
905	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTAA AGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAA GGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGG AAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCAG AGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAG TCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACA GTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
906	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST

	GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
907	HYGMH
908	GINWNGGSTGYADSVKG
909	GHHSGYDGRFFDY
910	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
911	TGSSSNIGAGYNVH
912	TNNRRPS
913	AAWDASLSGWV
914	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
915	CACTATGGCATGCAC
916	GGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
917	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
918	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
919	ACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
920	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
921	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
922	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
923	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV

[2560]

[2561]

	TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
924	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCAAG
925	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTA AAGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACA AGGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCA GAGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAA GTCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGAC AGTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
926	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST

[2562]

	GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
927	HYGMH
928	GINWNGGSTGYADSVKG
929	GHHSGYDGRFFDY
930	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
931	TGSSSNIGAGYNVH
932	TNNRRPS
933	AAWDASLSGWV
934	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
935	CACTATGGCATGCAC
936	GGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
937	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
938	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
939	ACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
940	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
941	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
942	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
943	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV

[2563]

	TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
944	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCCACTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCAAG
945	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCATCTGTGTCTGGCGCCCCTGGACAGAGAGTGACCA TCAGCTGTACAGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCTA TCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTTC TCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTAA AGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAA GGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGG AAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCAG AGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAG TCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACA GTGGCCCCTACCGAGTGCAGC
946	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST

[2564]

	GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSS
947	SYGMH
948	AINWNGGSTGYADSVKG
949	GHHSGYDGRFFDY
950	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVL
951	TGSSSNIGAGYNVH
952	TNNRRPS
953	AAWDASLSGWV
954	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCA
955	AGCTATGGCATGCAC
956	GCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTACAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
957	GGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTAT
958	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTA
959	ACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCAC
960	ACCAACAACAGACGGCCCAGC
961	GCCGCCTGGGATGCTTCTCTGAGCGGATGGGTT
962	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHHSGYDGRFFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
963	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKLLIYTNNRRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDASLSGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV

[2565]

	TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
964	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGATCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGAC AGGCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATCAACTGGAATGGCGGCTCTA CAGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCCAGAGGCCACCACAGCGGCTACGACGGCAGATTCTTTGACTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTTCTTCAGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGC CCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACC GGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCAAG
965	CAGTCTGTTCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCACACCTGGACAGAGAGTGACC ATCAGCTGTACCGGCAGCAGCTCCAATATCGGAGCCGGCTACAACGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCTGGCACAGCCCCTAAACTGCTGATCTACACCAACAACAGACGGCCC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCAAGAGCGGCACAAGCGCCAGCCTGGCT ATCTCTGGACTGAGATCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCGCCGCCTGGGATGCTT CTCTGAGCGGATGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTGCTAGGCCAGCCTA AAGCCGCCCCTAGCGTGACCCTGTTCCCTCCAAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACA AGGCCACCCTCGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTATCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGATAGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCACCCCTAGCAAGCA GAGCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAA GTCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGAC AGTGGCCCCTACCGAGTGCAGC

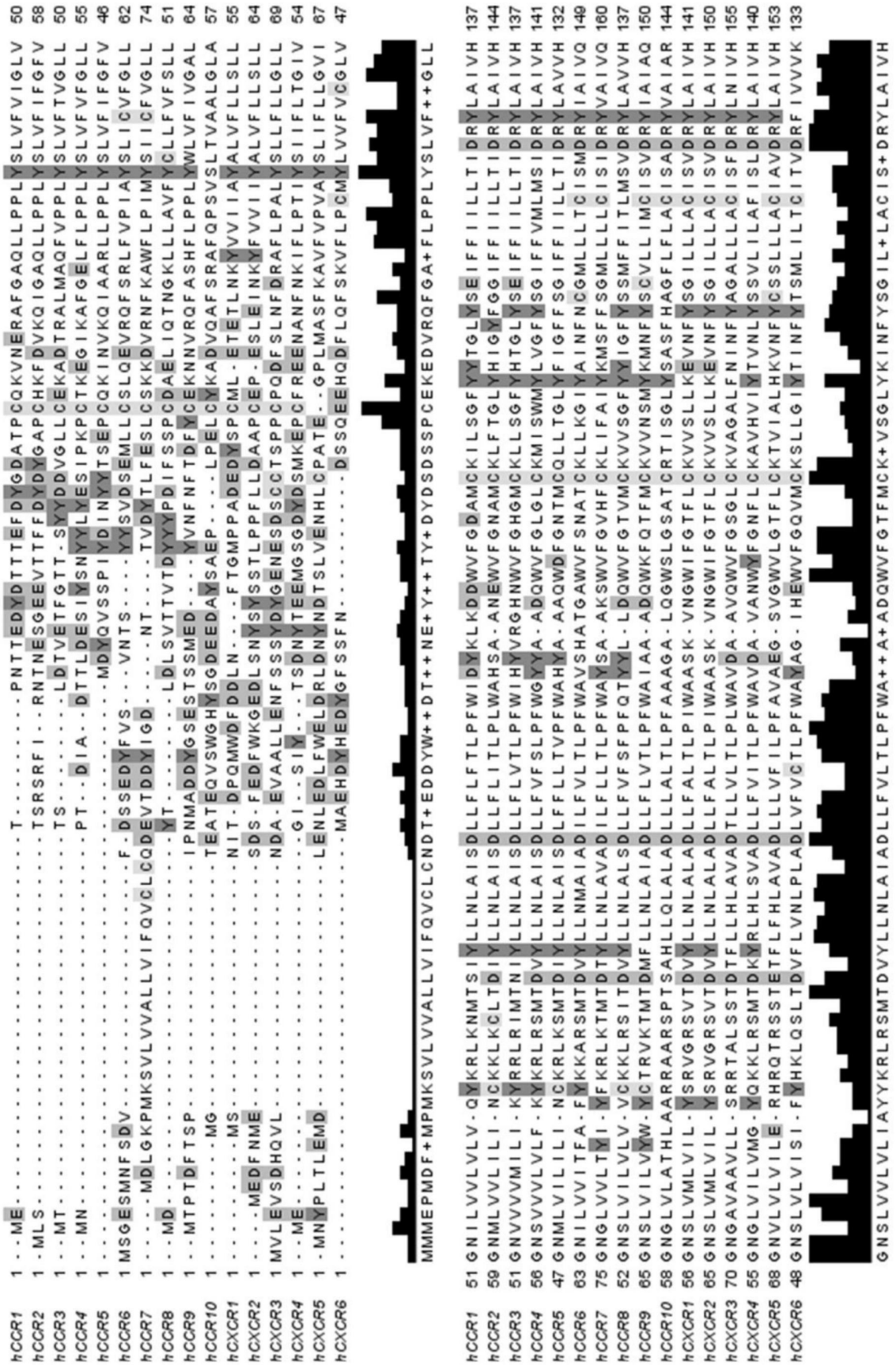


图1



图1(续)


hCCR1 303 FVGERFRKYLRQLFH-RRVAVHLVKWLPFLSVDRLERVSSTSPS----TGEHELSAGF---------- 355
hCCR2 307 FVGEKFRSLFHIALG-CRIAPLQKPVCGGPGV-RPGKNVKVTTQGLLDGRGKGKSIGRAPEASLQDKEGA 374
hCCR3 303 FVGERFRKYLRHFFH-RHLLMHLGRYIPFLPSEKLERTSSVSPS----TAEPELSIVF---------- 355
hCCR4 306 FLGEKFRKYILQLFKTCRGLFVLCQYCGLLQIYSADTPSSSYTQSTMDHDLHDAL---------- 360
hCCR5 299 FVGEKFRNYLLVFFQ-KHIAKRFCKCCSIFQQEAPERASSVYTRST----GEQEISVGL---------- 352
hCCR6 318 FIGQKFRNYFLKILKDL-WCVRRKYKSSGFSCAGRYSENISRQTSET--ADNDNASSFTM---------- 374
hCCR7 328 FIGVKFRNDLFKLFKDL-GCLSQEQLRQWSSCRHI-RRS----SMS--VEAETTTTFSP---------- 378
hCCR8 302 FVGEKFKKHLSEIFQKS-CSQIFNYLGRQMPRESCEKSSSCQQH-----SSRSSSVDYIL---------- 355
hCCR9 319 FVGERFRRDLVKTLKNL-GCISQAQWVSFTRREGSLKLS-------SML--LETTS-GALSL---------- 369
hCCR10 312 FLGLRFRQDLRRLLRGG-SCPSGPQPRRGCPRRPRLSSC-------SA---PTETHSLSWDN---------- 362
hCXCR1 307 FIGQNFRHGFLKILAMH-GLVSKEF-----LARHRVTSYT-------SSS--VNVSSNL---------- 350
hCXCR2 316 FIGQKFRHGLLKILAIH-GLISKDS-----LPKDSRPSFV-------GSS--SGHTSTTL---------- 360
hCXCR3 320 FVGVKFRERMWMLLLRL-GCPNQRG-----LQRQPSSSRR-------DSS--WSETSEASYSGL---------- 368
hCXCR4 304 FLGAKFKTSAQHALTSVSRG-----SSLKILSKGKRGGHSSVSTESES--SSFHSS---------- 352
hCXCR5 324 FAGVKFRSDLSRLLTKL-GCTGPASLCQLFPSWRRSSLS-------ES---ENATSLTTF---------- 372
hCXCR6 280 FVSLKFRKNFWKLVKDI-GCLPYLGVSHQW-----KSSEDNSKTFSAS--HNVEATSMFQL---------- 342
Consensus FVGEKFRKYLLKLLKDLRGC+SQ+QLCS+LPRERRES+SSVST+SSSDTSEH+SST+FSL+ASLQDKEGA

图1(续)

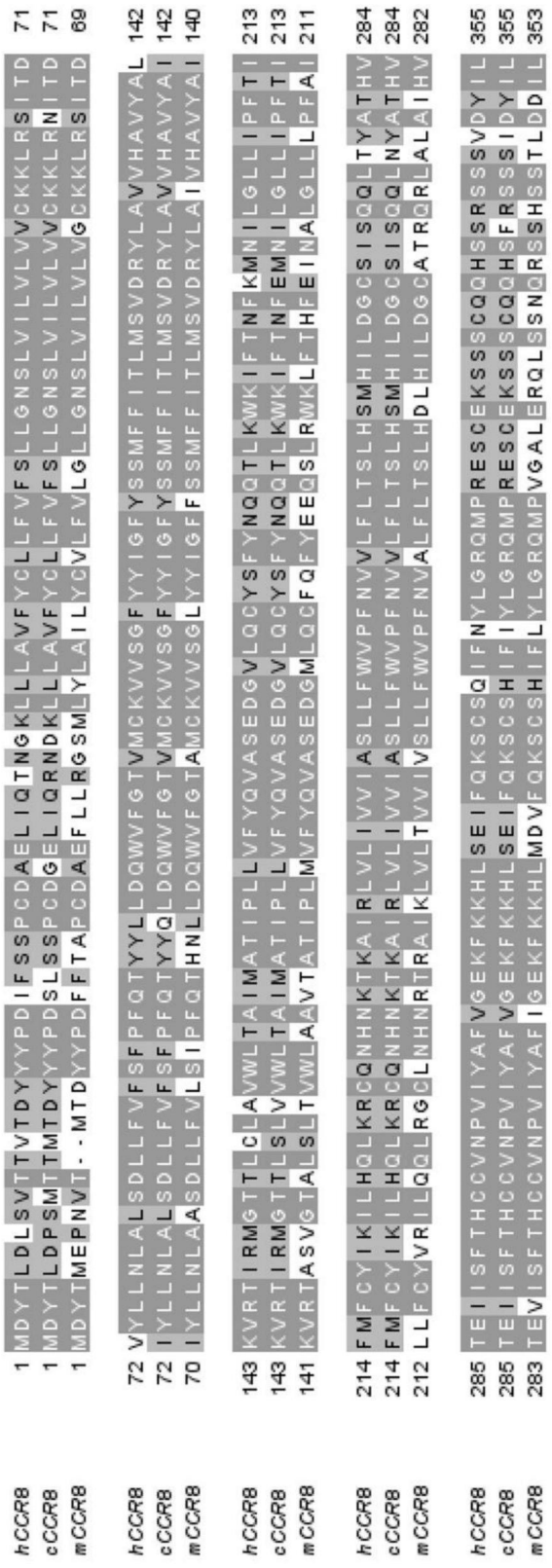

hCCR8
cCCR8
mCCR8
1 MDYTLDLSVTTVTDYYYPDIFSSPCDAELIQTNGKLLLAVFYCLLFVFSLLGNSLVILVLVVCKKLRSITD 71
1 MDYTLDPSMTTMTDYYYPDSLSSPCDGELIQRNDKLLLAVFYCLLFVFSLLGNSLVILVLVVCKKLRNITD 71
1 MDYTMEPNVT--MTDYYYPDFFTAPCDAEFLLRGSMLYLAILYCVLFVLGLLGNSLVILVLVGCKKLRSITD 69
72 VYLLNLALSDLLFVFSFPFQTYYLLDQWVFGTVMCKVVSGFYYIGFYSSMFFITLMSVDRYLAVVHAVYAL 142
72 IYLLNLALSDLLFVFSFPFQTYYQLDQWVFGTVMCKVVSGFYYIGFYSSMFFITLMSVDRYLAVVHAVYAI 142
70 IYLLNLAASDLLFVLSIPFQTHNLLDQWVFGTAMCKVVSGLYYIGFFSSMFFITLMSVDRYLAIVHAVYAI 140
143 KVRTIRMGTTLCLAVWLTAIMATIPLLVFYQVASEDGVLQCYSFYNQQTLKWKIFTNFKMNILGLLIPFTI 213
143 KVRTIRMGTTLSLVVWLTAIMATIPLLVFYQVASEDGVLQCYSFYNQQTLKWKIFTNFEMNILGLLIPFTI 213
141 KVRTASVGTALSLTVWLAAVTATIPLMVFYQVASEDGMLQCFQFYEEQSLRWKLFTHFEINALGLLLPFAI 211
214 FMFCYIKILHQLKRCQNHNKTKAIRLVLIVVIASLLFWVPFNVVLFLTSLHSMHILDGCSISQQLTYATHV 284
214 FMFCYIKILHQLKRCQNHNKTKAIRLVLIVVIASLLFWVPFNVVLFLTSLHSMHILDGCSISQQLNYATHV 284
212 LLFCYVRILQQLRGCLNHNRTRAIKLVLTVVIVSLLFWVPFNVALFLTSLHDLHILDGCATRQRLALAIHV 282
285 TEIISFTHCCVNPVIYAFVGEKFKKHLSEIFQKSCSQIFNYLGRQMPRESCEKSSSCQQHSSRSSSVDYIL 355
285 TEIISFTHCCVNPVIYAFVGEKFKKHLSEIFQKSCSHIFIYLGRQMPRESCEKSSSCQQHSFRSSSIDYIL 355
283 TEVISFTHCCVNPVIYAFIGEKFKKHLMDVFQKSCSHIFLYLGRQMPVGALERQLSSNQRSSHSSTLDDIL 353

图2a

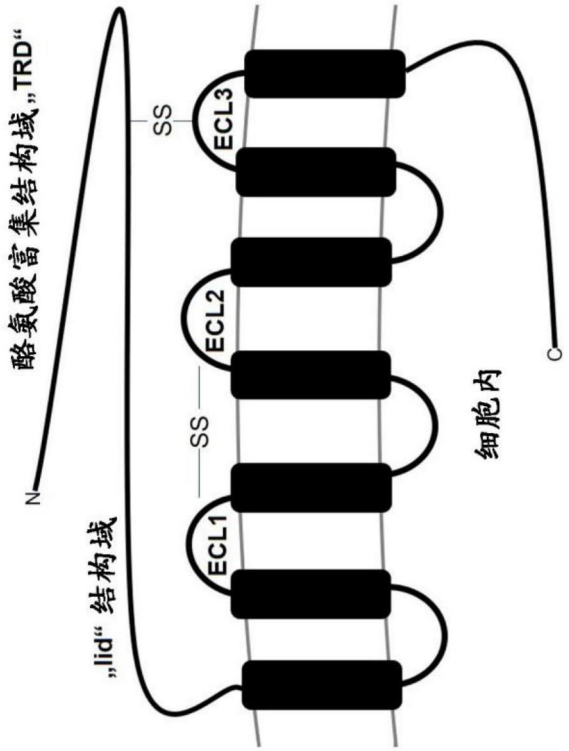


图2b

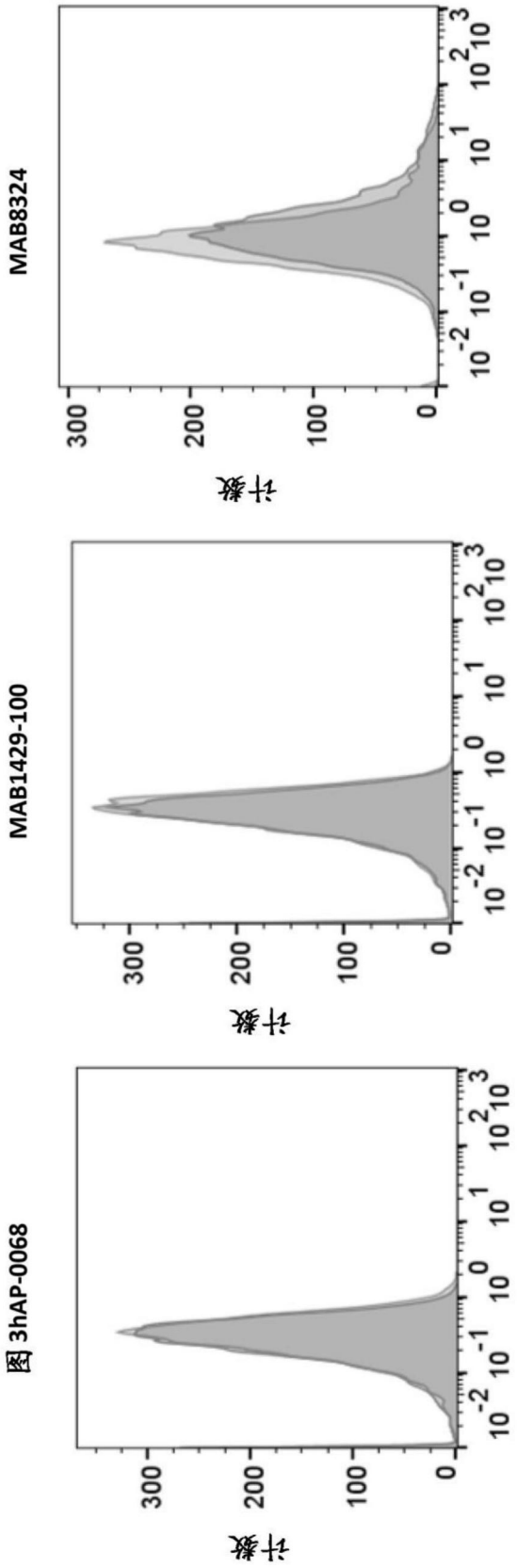

MAB8324
计数
300
200
100
0
10^-2
10^-1
10^0
10^1
10^2
10^3
MAB1429-100
计数
300
200
100
0
10^-2
10^-1
10^0
10^1
10^2
10^3
图 3hAP-0068
计数
300
200
100
0
10^-2
10^-1
10^0
10^1
10^2
10^3

图3

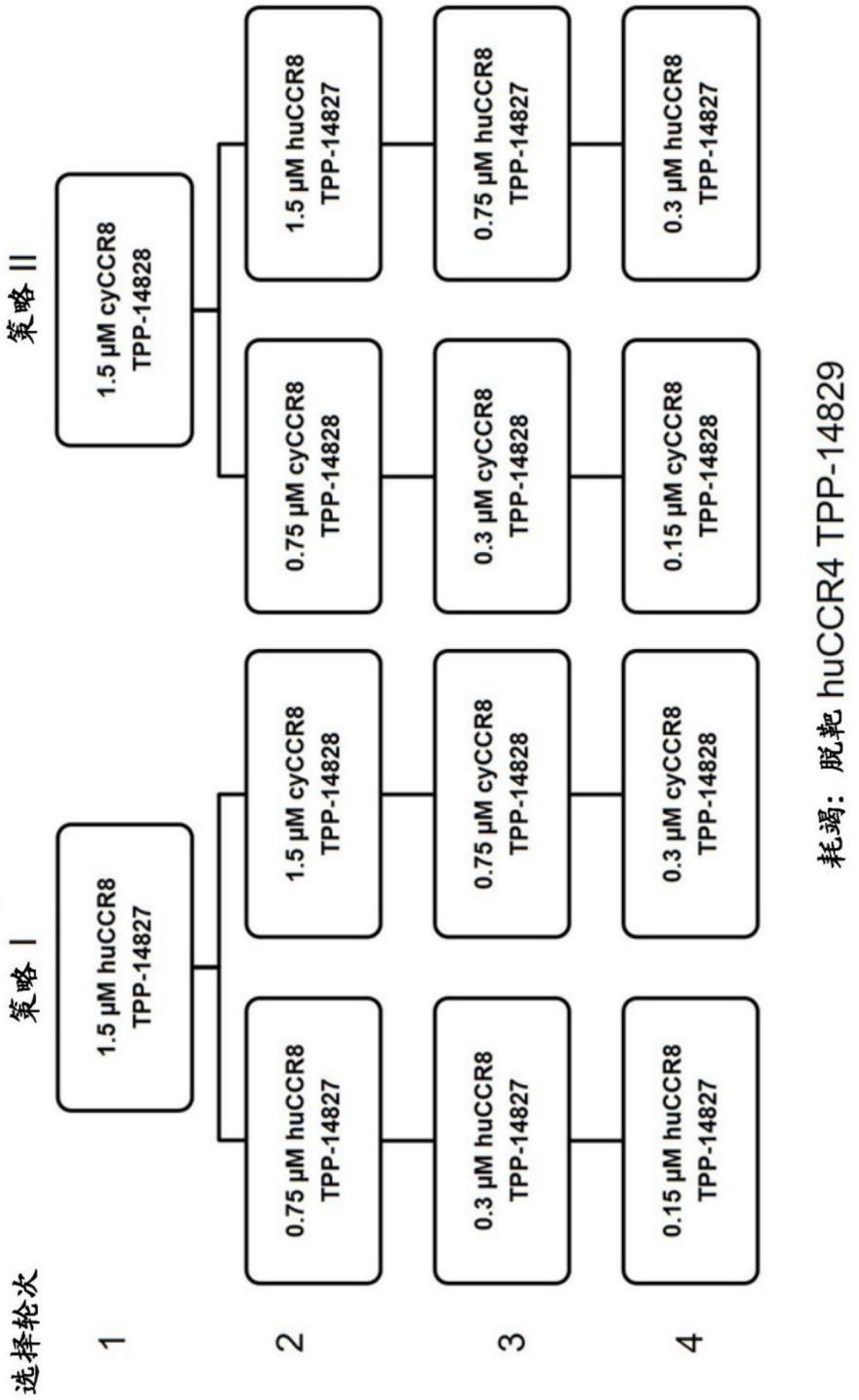

选择轮次
策略 I
策略 II
1
2
3
4
1.5 μM huCCR8 TPP-14827
0.75 μM huCCR8 TPP-14827
0.3 μM huCCR8 TPP-14827
0.15 μM huCCR8 TPP-14827
1.5 μM cyCCR8 TPP-14828
0.75 μM cyCCR8 TPP-14828
0.3 μM cyCCR8 TPP-14828
0.15 μM cyCCR8 TPP-14828
1.5 μM cyCCR8 TPP-14828
0.75 μM cyCCR8 TPP-14828
0.3 μM cyCCR8 TPP-14828
1.5 μM huCCR8 TPP-14827
0.75 μM huCCR8 TPP-14827
0.3 μM huCCR8 TPP-14827
耗竭：脱靶 huCCR4 TPP-14829

图4

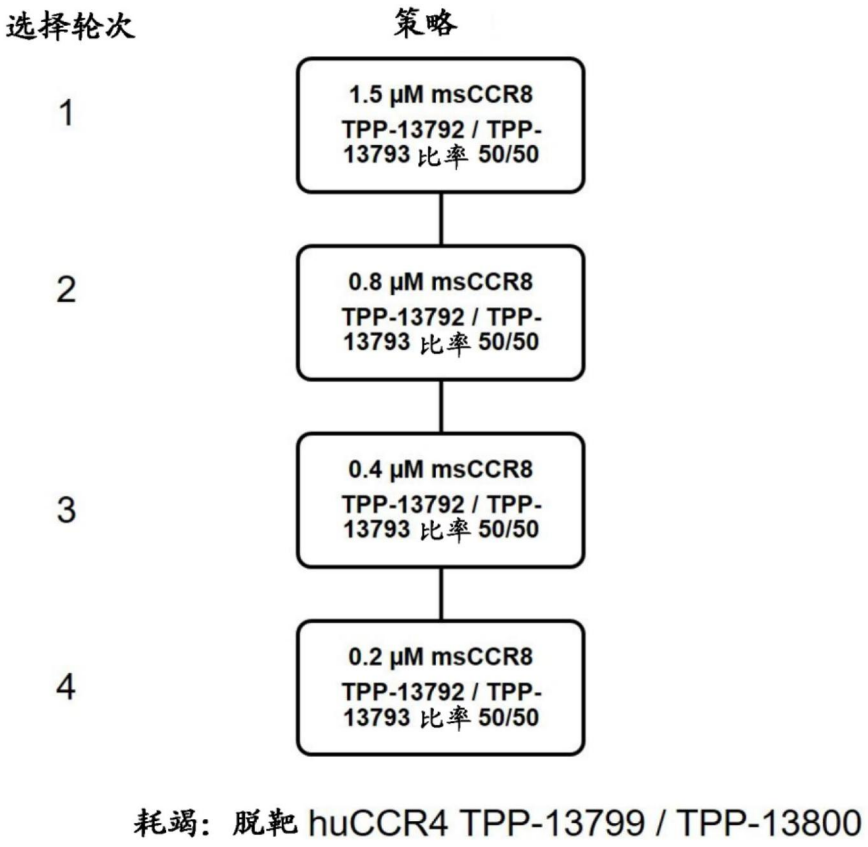

选择轮次
策略
1
1.5 μM msCCR8
TPP-13792 / TPP-13793 比率 50/50
2
0.8 μM msCCR8
TPP-13792 / TPP-13793 比率 50/50
3
0.4 μM msCCR8
TPP-13792 / TPP-13793 比率 50/50
4
0.2 μM msCCR8
TPP-13792 / TPP-13793 比率 50/50
耗竭：脱靶 huCCR4 TPP-13799 / TPP-13800

图5

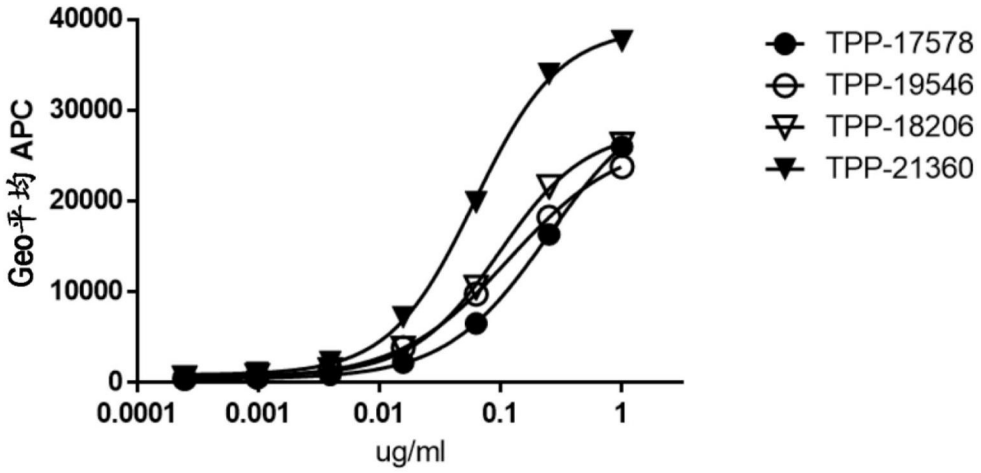

Geo平均 APC
40000
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
ug/ml
TPP-17578
TPP-19546
TPP-18206
TPP-21360

图6

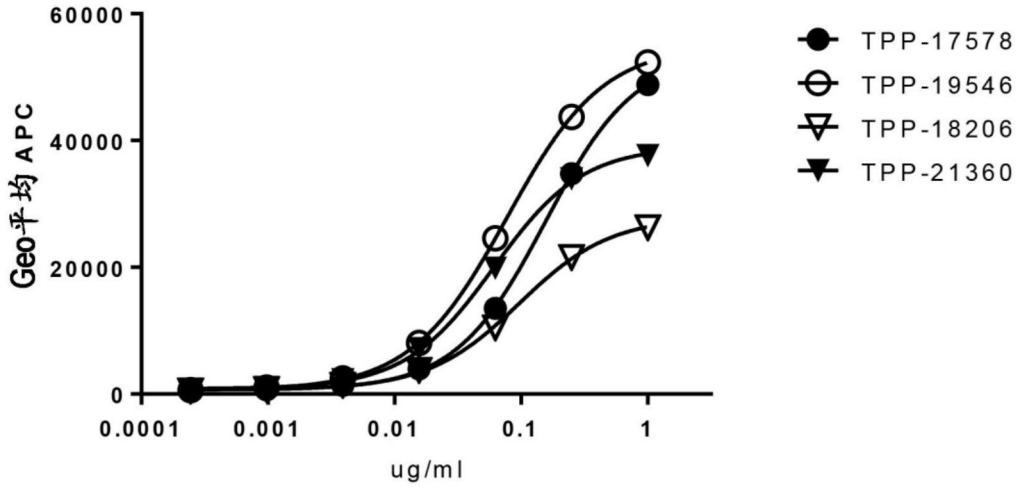

60000
40000
20000
0
Geo平均 APC
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
ug/ml
TPP-17578
TPP-19546
TPP-18206
TPP-21360

图7

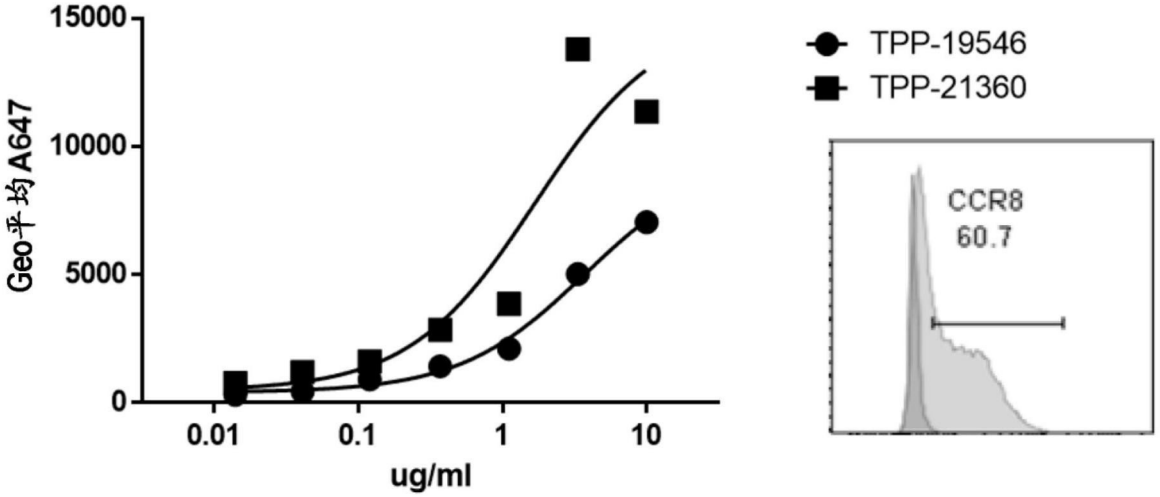

15000
10000
5000
0
Geo平均A647
0.01
0.1
1
10
ug/ml
TPP-19546
TPP-21360
CCR8
60.7

图8

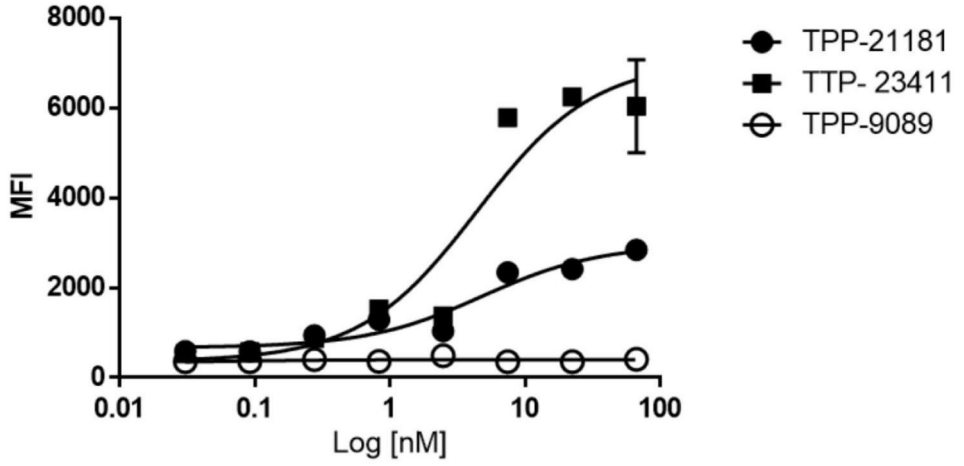

8000
6000
4000
2000
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
Log [nM]
TPP-21181
TTP- 23411
TPP-9089

图9

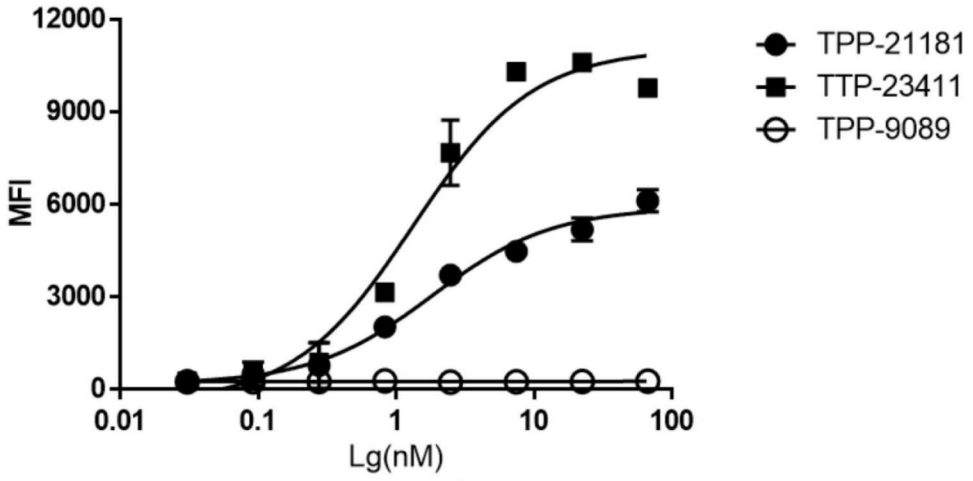

12000
9000
6000
3000
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
Lg(nM)
TPP-21181
TTP-23411
TPP-9089

图10

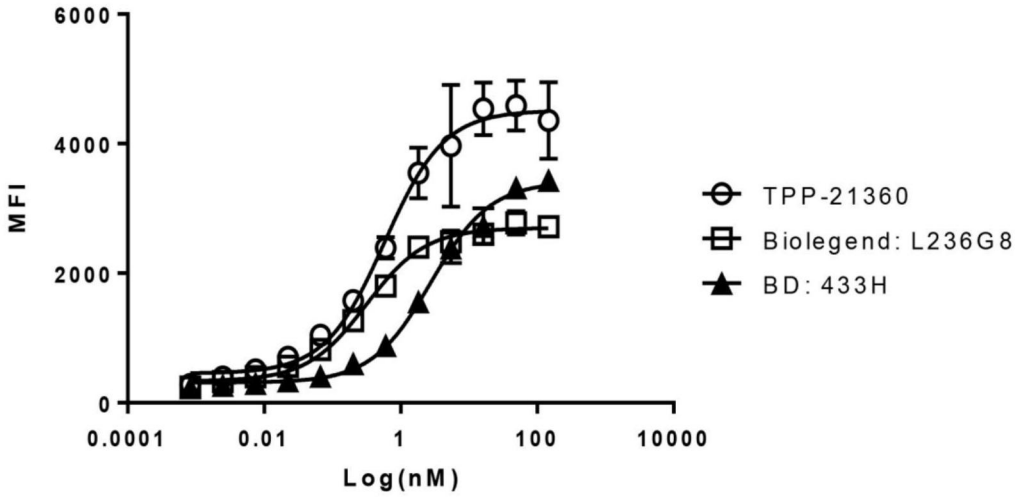

6000
4000
2000
0
MFI
0.0001
0.01
1
100
10000
Log(nM)
TPP-21360
Biolegend: L236G8
BD: 433H

图11

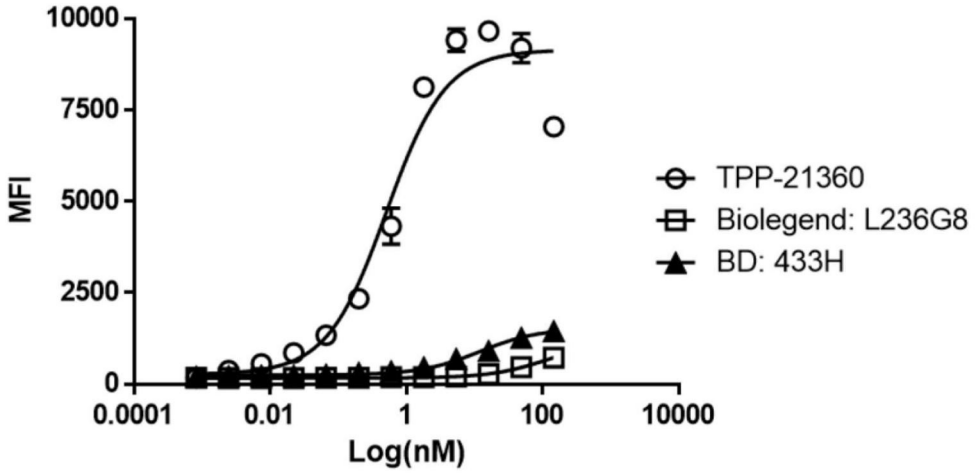

10000
7500
5000
2500
0
MFI
0.0001
0.01
1
100
10000
Log(nM)
TPP-21360
Biolegend: L236G8
BD: 433H

图12

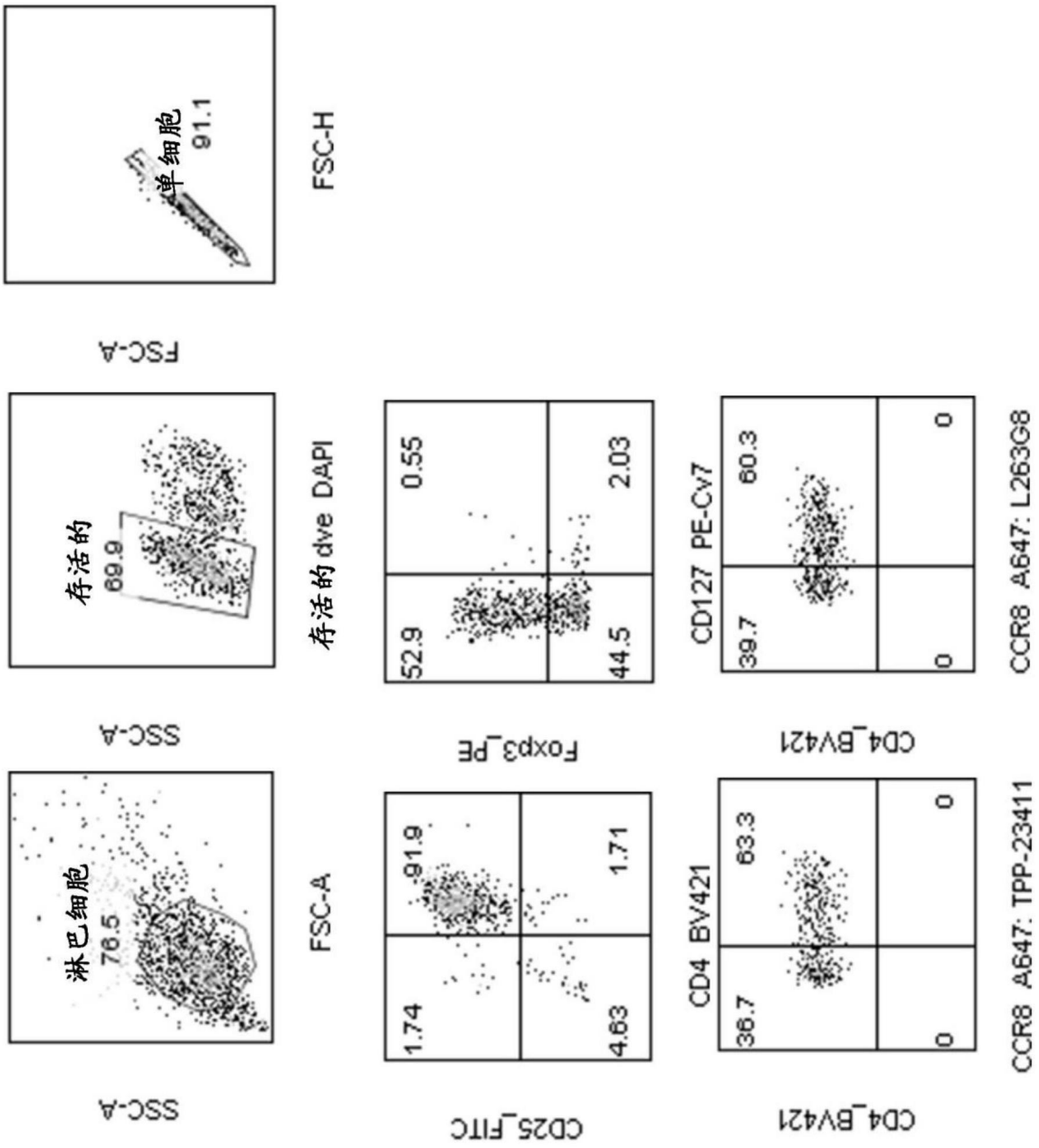

单细胞
91.1
FSC-H
FSC-A
存活的
69.9
存活的 dve DAPI
SSC-A
52.9
0.55
2.03
44.5
Foxp3_PE
CD127 PE-Cy7
60.3
39.7
0
0
CD4_BV421
CCR8 A647: L263G8
淋巴细胞
76.5
FSC-A
SSC-A
1.74
91.9
1.71
4.63
CD25_FITC
CD4 BV421
63.3
36.7
0
0
CD4_BV421
CCR8 A647: TPP-23411

图13

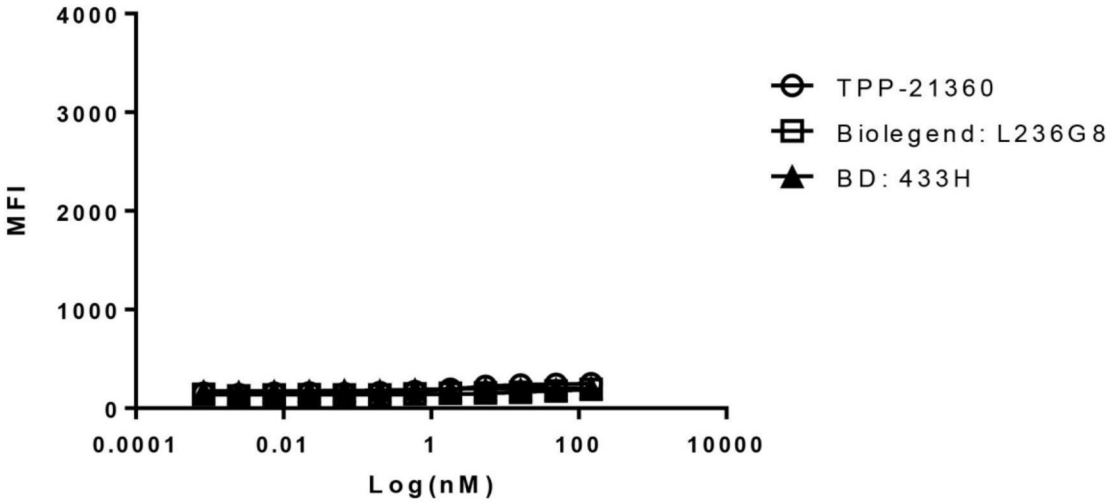

4000
3000
2000
1000
0
MFI
0.0001
0.01
1
100
10000
Log(nM)
TPP-21360
Biolegend: L236G8
BD: 433H

图14

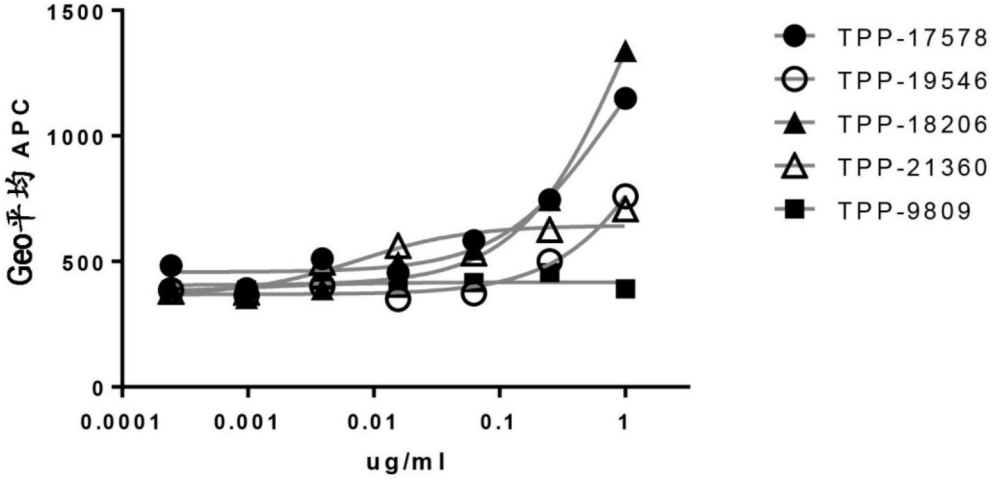

1500
1000
500
0
Geo平均 APC
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
ug/ml
TPP-17578
TPP-19546
TPP-18206
TPP-21360
TPP-9809

图15

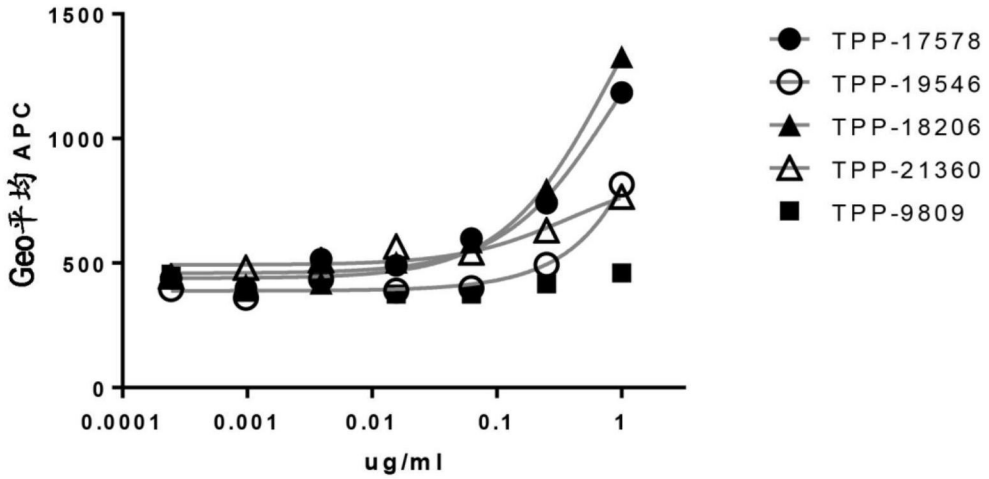

1500
1000
500
0
Geo平均 APC
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
ug/ml
TPP-17578
TPP-19546
TPP-18206
TPP-21360
TPP-9809

图16

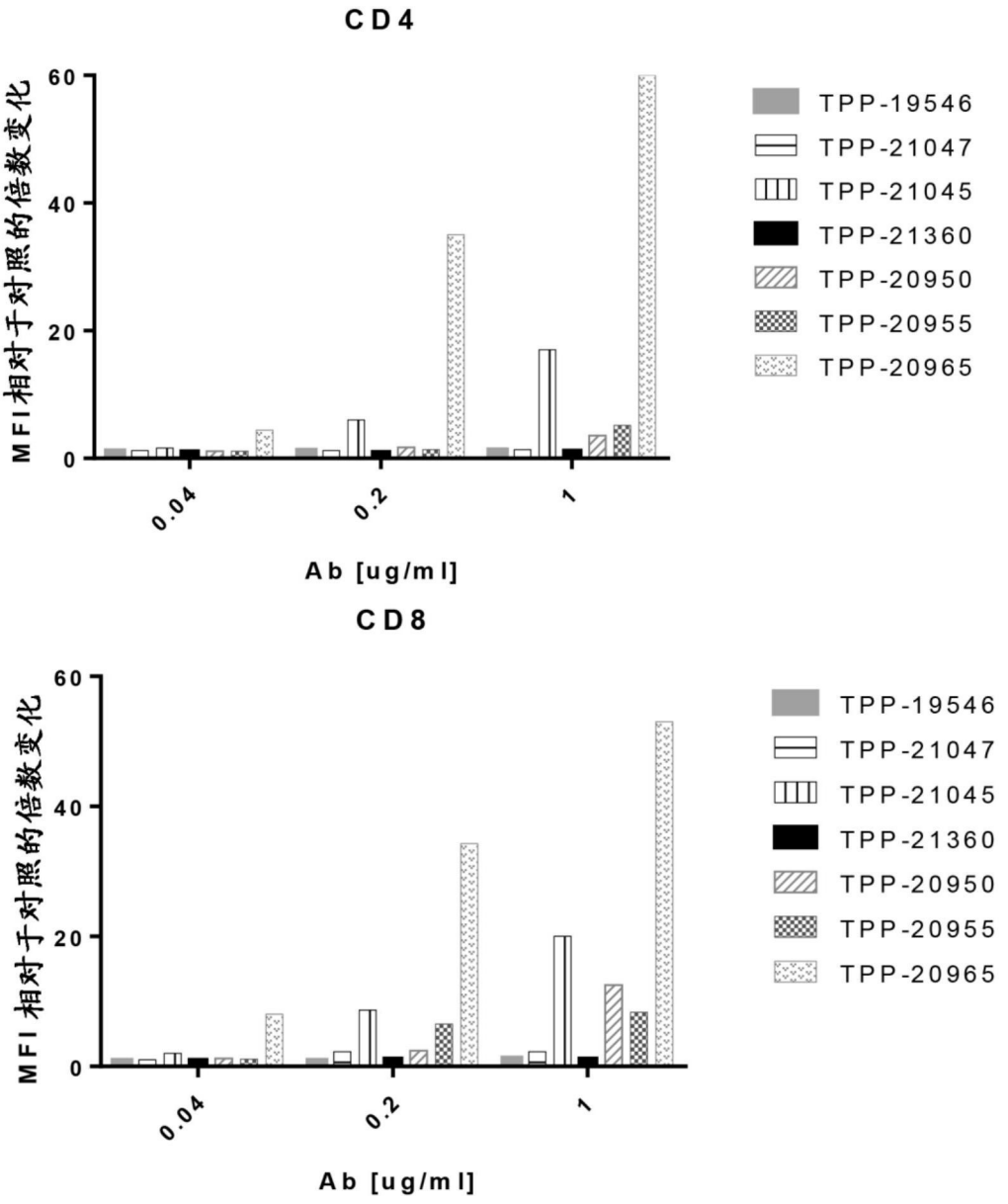

CD4
MFI相对于对照的倍数变化
60
40
20
0
0.04
0.2
1
Ab [ug/ml]
TPP-19546
TPP-21047
TPP-21045
TPP-21360
TPP-20950
TPP-20955
TPP-20965
CD8
MFI相对于对照的倍数变化
60
40
20
0
0.04
0.2
1
Ab [ug/ml]
TPP-19546
TPP-21047
TPP-21045
TPP-21360
TPP-20950
TPP-20955
TPP-20965

图17

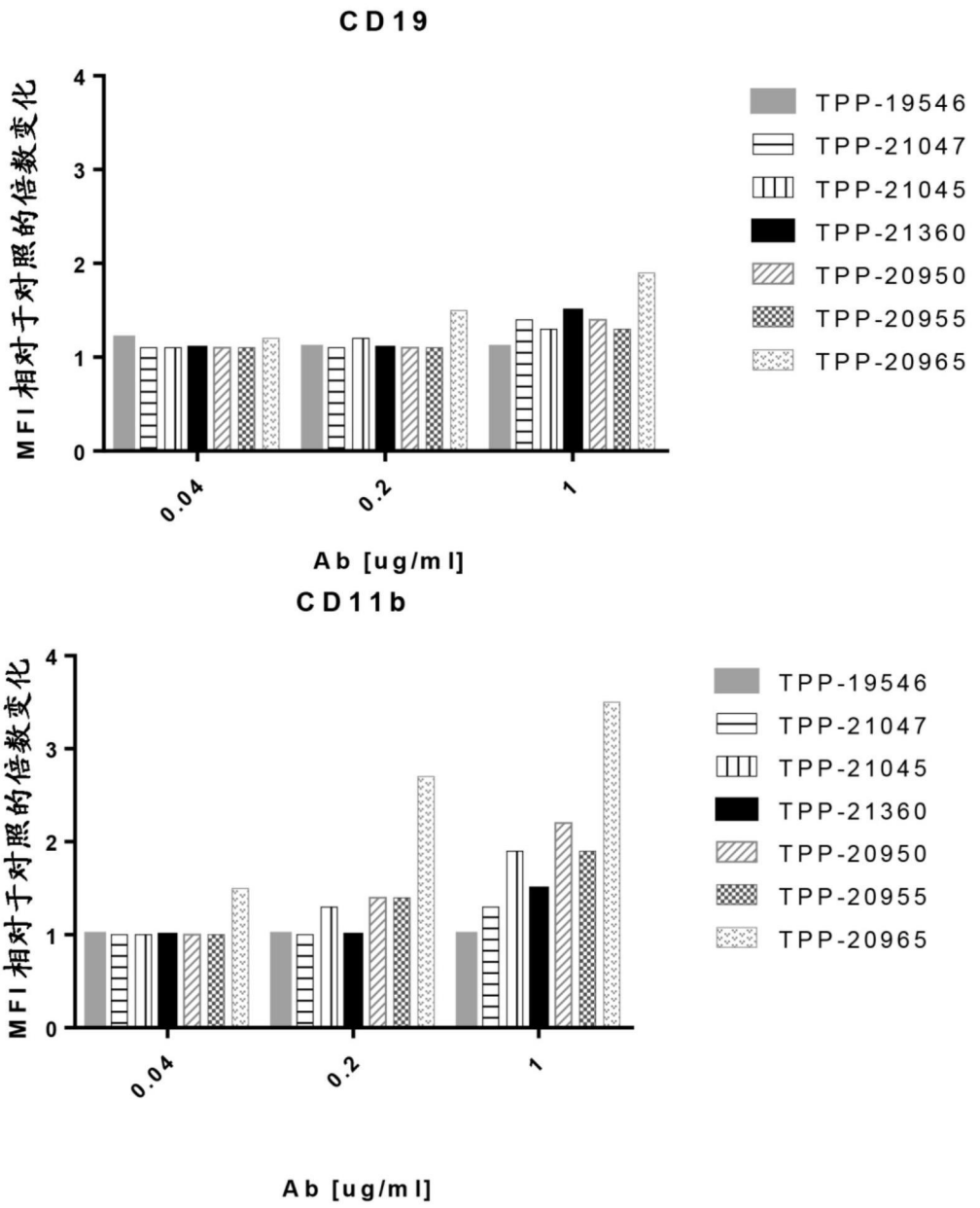

CD19
MFI相对于对照的倍数变化
4
3
2
1
0
0.04
0.2
1
Ab [ug/ml]
TPP-19546
TPP-21047
TPP-21045
TPP-21360
TPP-20950
TPP-20955
TPP-20965
CD11b
MFI相对于对照的倍数变化
4
3
2
1
0
0.04
0.2
1
Ab [ug/ml]
TPP-19546
TPP-21047
TPP-21045
TPP-21360
TPP-20950
TPP-20955
TPP-20965

图17(续)

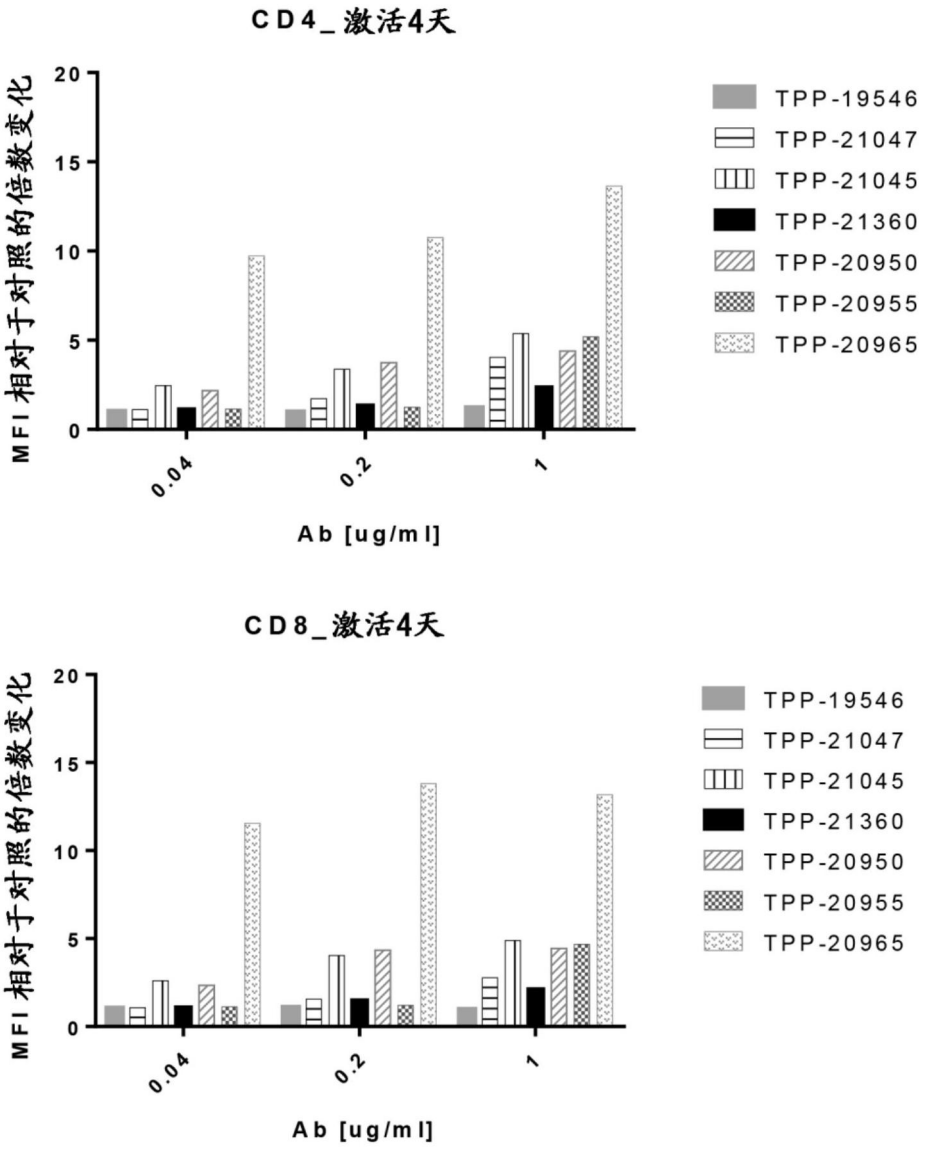

CD4_激活4天
MFI相对于对照的倍数变化
20
15
10
5
0
0.04
0.2
1
Ab [ug/ml]
TPP-19546
TPP-21047
TPP-21045
TPP-21360
TPP-20950
TPP-20955
TPP-20965
CD8_激活4天
MFI相对于对照的倍数变化
20
15
10
5
0
0.04
0.2
1
Ab [ug/ml]
TPP-19546
TPP-21047
TPP-21045
TPP-21360
TPP-20950
TPP-20955
TPP-20965

图17(续)

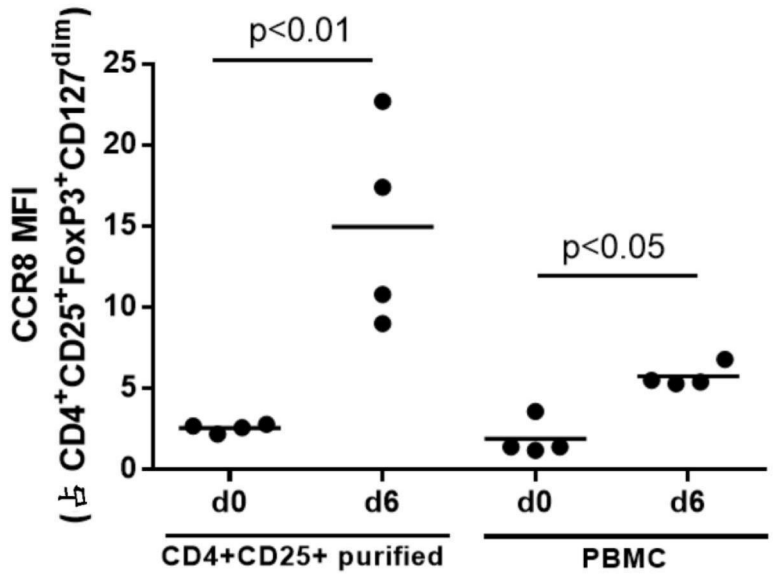

p<0.01
p<0.05
CCR8 MFI
(占 CD4+CD25+FoxP3+CD127dim)
25
20
15
10
5
0
d0
d6
d0
d6
CD4+CD25+ purified
PBMC

图18

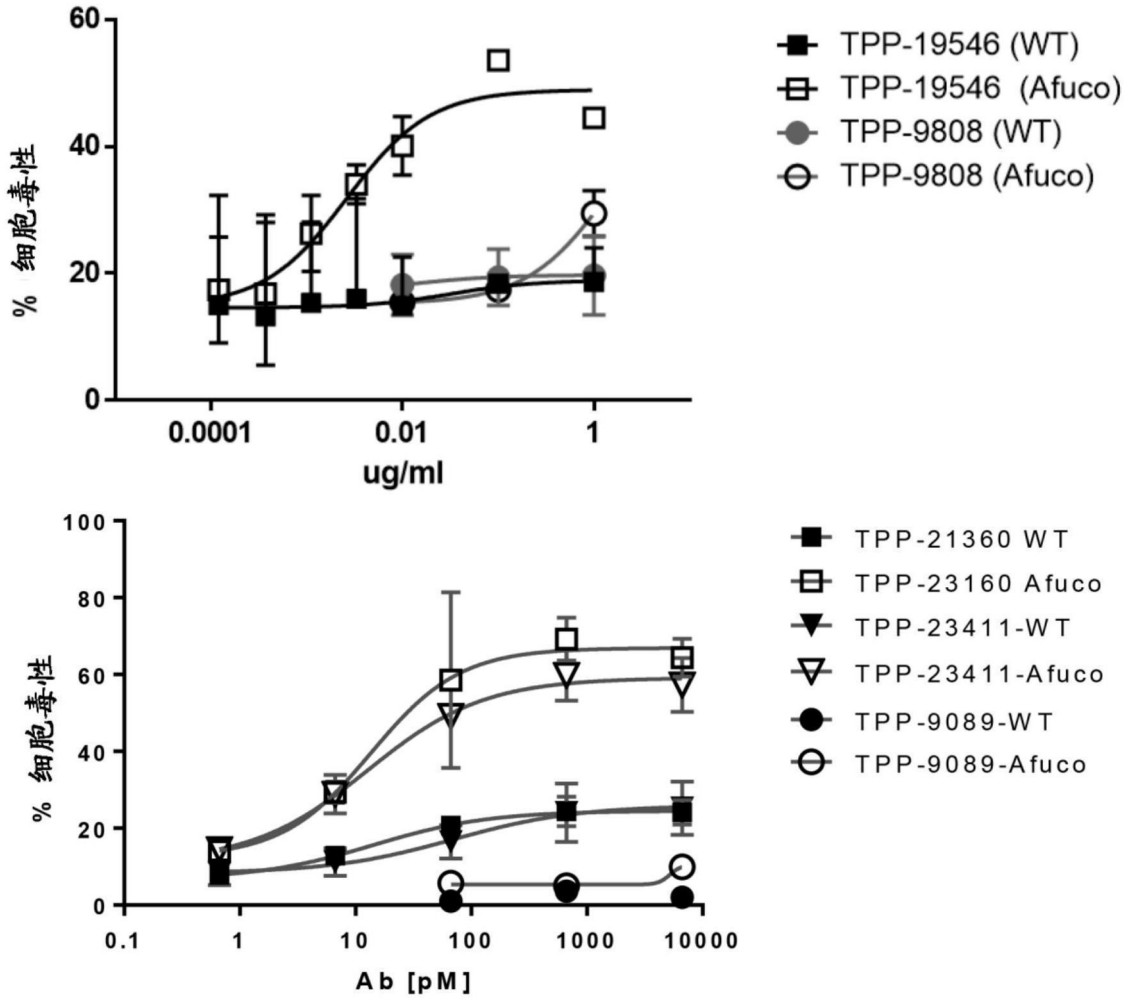

60
40
20
0
% 细胞毒性
0.0001
0.01
1
ug/ml
TPP-19546 (WT)
TPP-19546 (Afuco)
TPP-9808 (WT)
TPP-9808 (Afuco)
100
80
60
40
20
0
% 细胞毒性
0.1
1
10
100
1000
10000
Ab [pM]
TPP-21360 WT
TPP-23160 Afuco
TPP-23411-WT
TPP-23411-Afuco
TPP-9089-WT
TPP-9089-Afuco

图19

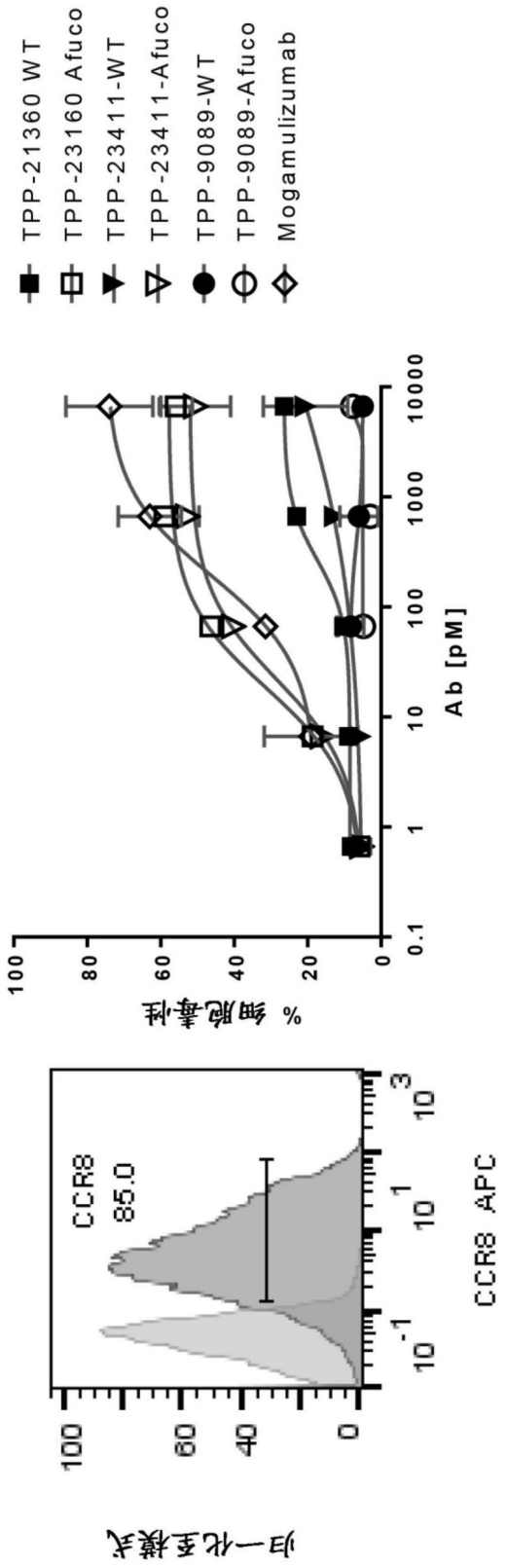

TPP-21360 WT
TPP-23160 Afuco
TPP-23411-WT
TPP-23411-Afuco
TPP-9089-WT
TPP-9089-Afuco
Mogamulizumab
% 细胞毒性
Ab [pM]
归一化至模式
CCR8
85.0
CCR8 APC

图20

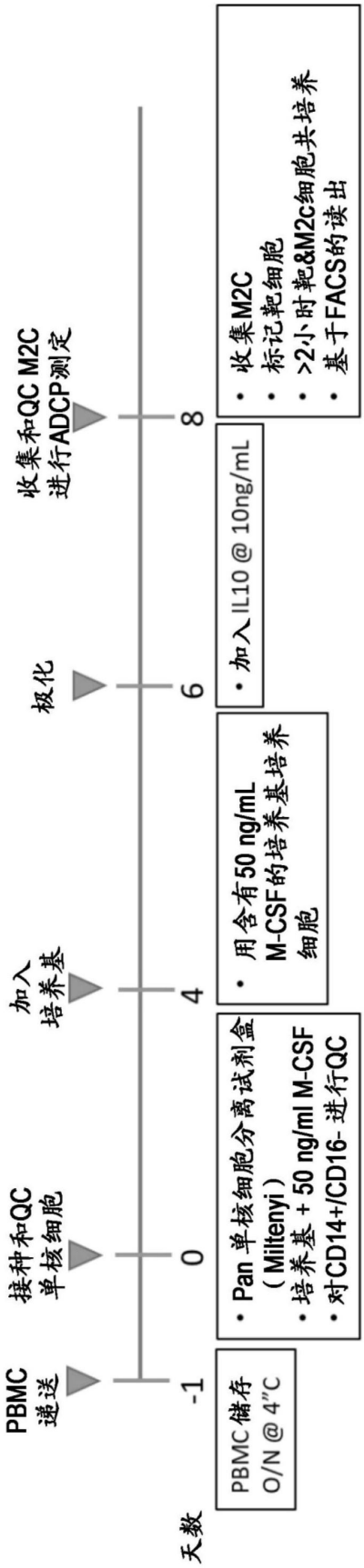

PBMC
递送
接种和QC
单核细胞
加入
培养基
极化
收集和QC M2C
进行ADCP测定
天数
-1
0
4
6
8
PBMC储存
O/N @ 4°C
• Pan 单核细胞分离试剂盒
（Miltenyi）
• 培养基 + 50 ng/ml M-CSF
• 对CD14+/CD16- 进行QC
• 用含有50 ng/mL
M-CSF的培养基培养
细胞
• 加入IL10 @ 10ng/mL
• 收集M2C
• 标记靶细胞
• >2小时靶&M2c细胞共培养
• 基于FACS的读出

图21

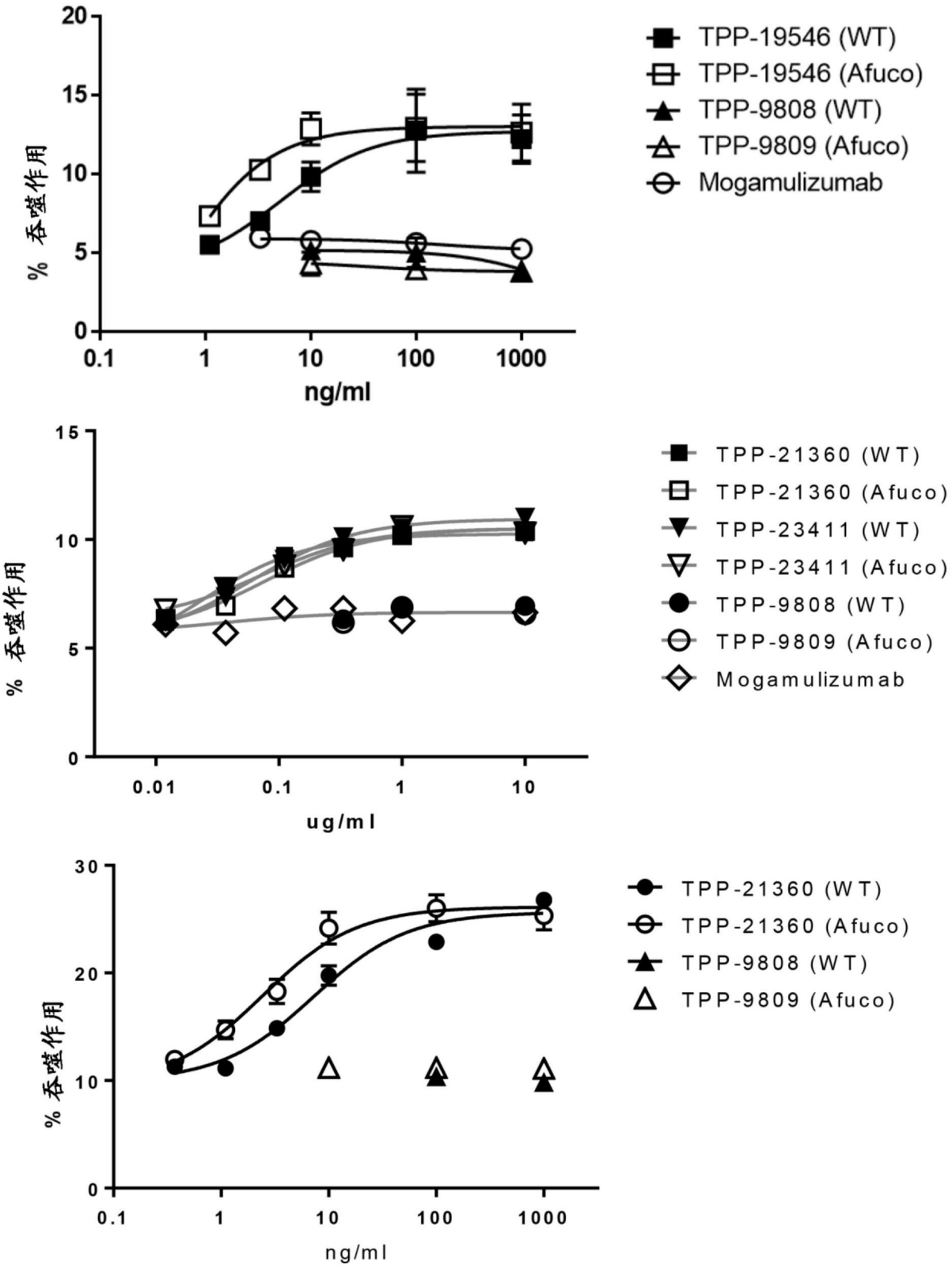

20
15
10
5
0
% 吞噬作用
0.1
1
10
100
1000
ng/ml
TPP-19546 (WT)
TPP-19546 (Afuco)
TPP-9808 (WT)
TPP-9809 (Afuco)
Mogamulizumab
15
10
5
0
% 吞噬作用
0.01
0.1
1
10
ug/ml
TPP-21360 (WT)
TPP-21360 (Afuco)
TPP-23411 (WT)
TPP-23411 (Afuco)
TPP-9808 (WT)
TPP-9809 (Afuco)
Mogamulizumab
30
20
10
0
% 吞噬作用
0.1
1
10
100
1000
ng/ml
TPP-21360 (WT)
TPP-21360 (Afuco)
TPP-9808 (WT)
TPP-9809 (Afuco)

图22

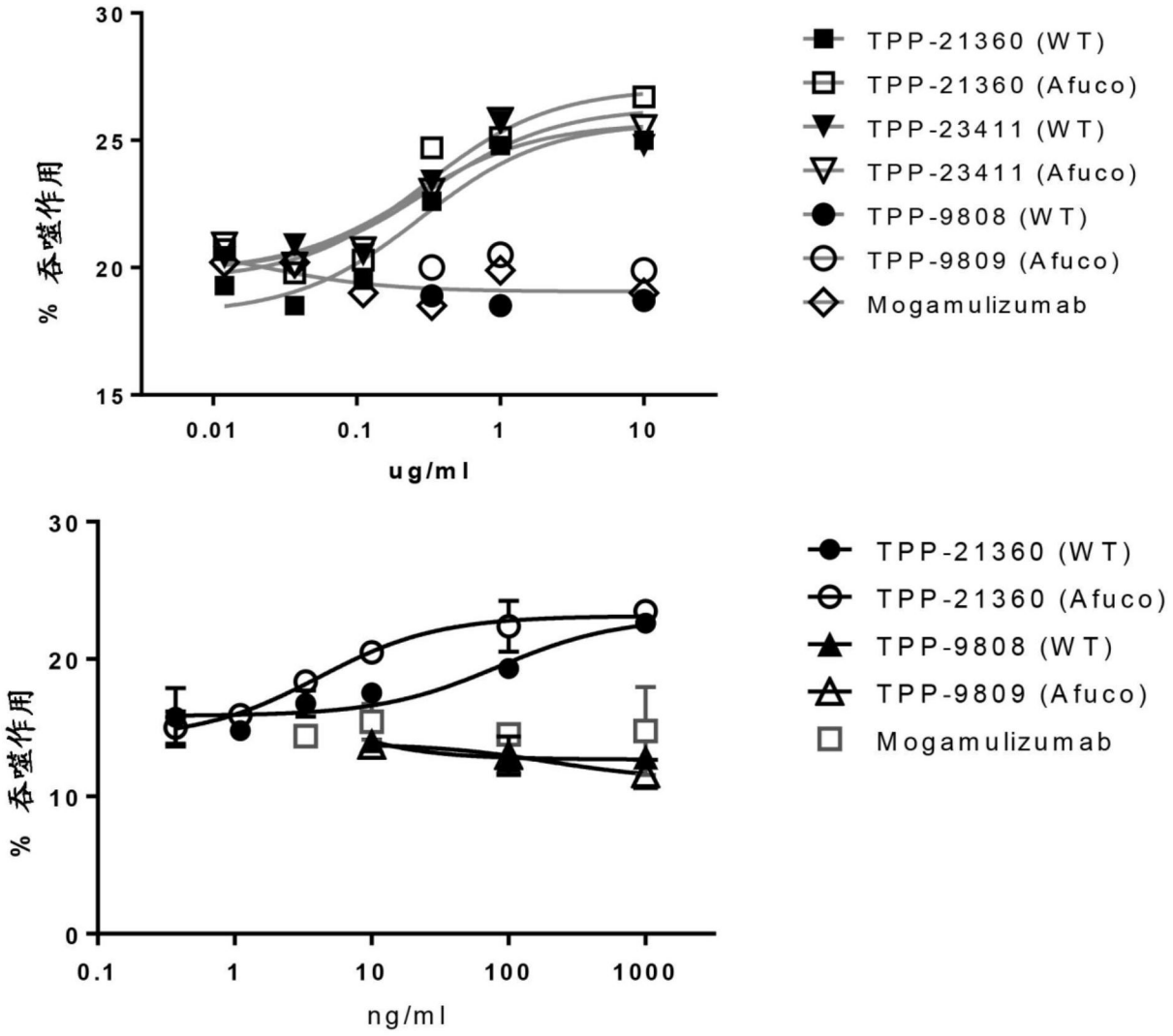

30
25
20
15
% 吞噬作用
0.01
0.1
1
10
ug/ml
TPP-21360 (WT)
TPP-21360 (Afuco)
TPP-23411 (WT)
TPP-23411 (Afuco)
TPP-9808 (WT)
TPP-9809 (Afuco)
Mogamulizumab
30
20
10
0
% 吞噬作用
0.1
1
10
100
1000
ng/ml
TPP-21360 (WT)
TPP-21360 (Afuco)
TPP-9808 (WT)
TPP-9809 (Afuco)
Mogamulizumab

图23

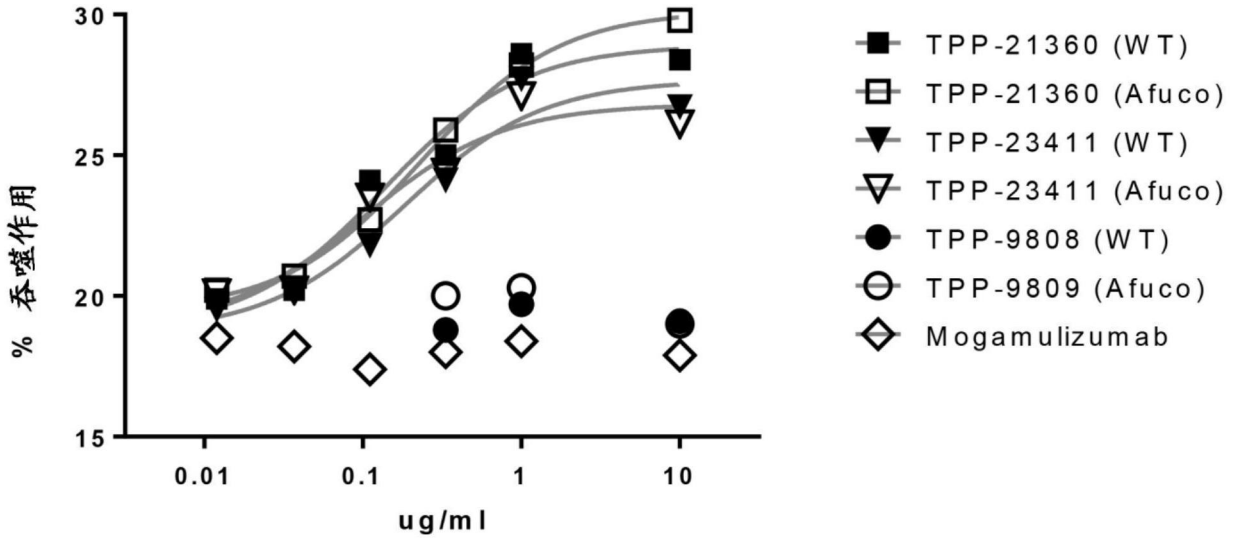

30
25
20
15
% 吞噬作用
0.01
0.1
1
10
ug/ml
TPP-21360 (WT)
TPP-21360 (Afuco)
TPP-23411 (WT)
TPP-23411 (Afuco)
TPP-9808 (WT)
TPP-9809 (Afuco)
Mogamulizumab

图24

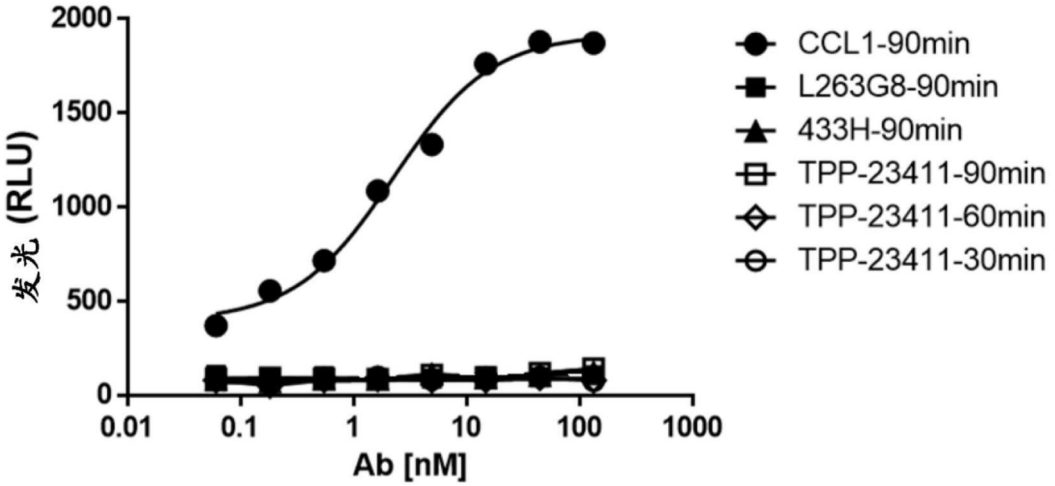

2000
1500
1000
500
0
发光 (RLU)
0.01
0.1
1
10
100
1000
Ab [nM]
CCL1-90min
L263G8-90min
433H-90min
TPP-23411-90min
TPP-23411-60min
TPP-23411-30min

图25

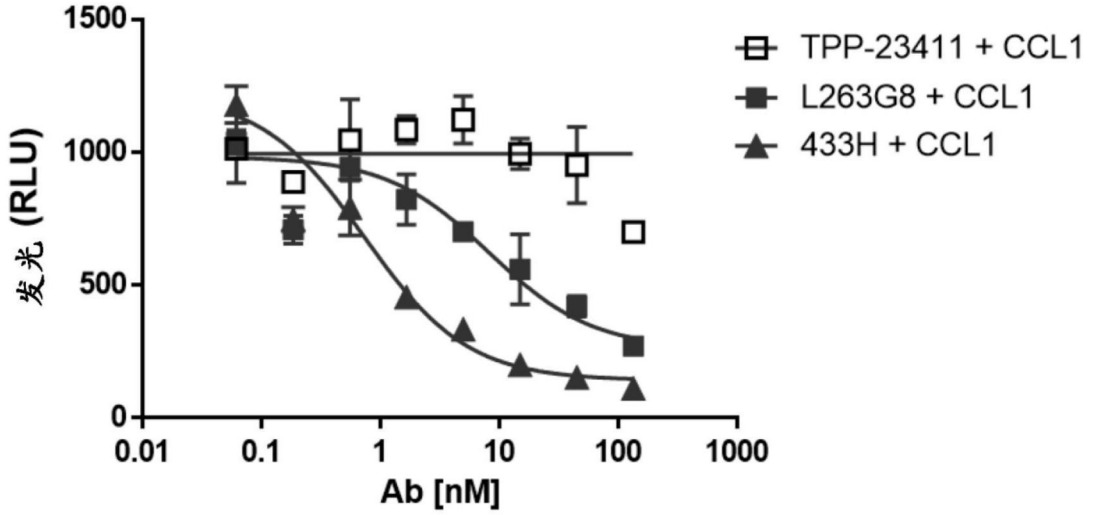

1500
1000
500
0
发光 (RLU)
0.01
0.1
1
10
100
1000
Ab [nM]
TPP-23411 + CCL1
L263G8 + CCL1
433H + CCL1

图26

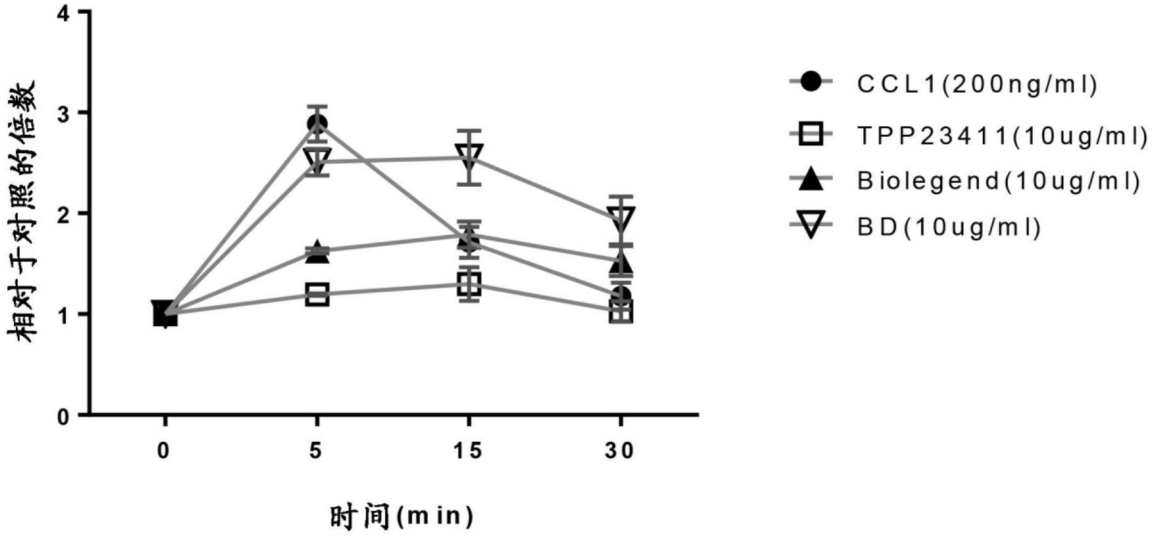

4
3
2
1
0
相对于对照的倍数
0
5
15
30
时间(min)
CCL1(200ng/ml)
TPP23411(10ug/ml)
Biolegend(10ug/ml)
BD(10ug/ml)

图27

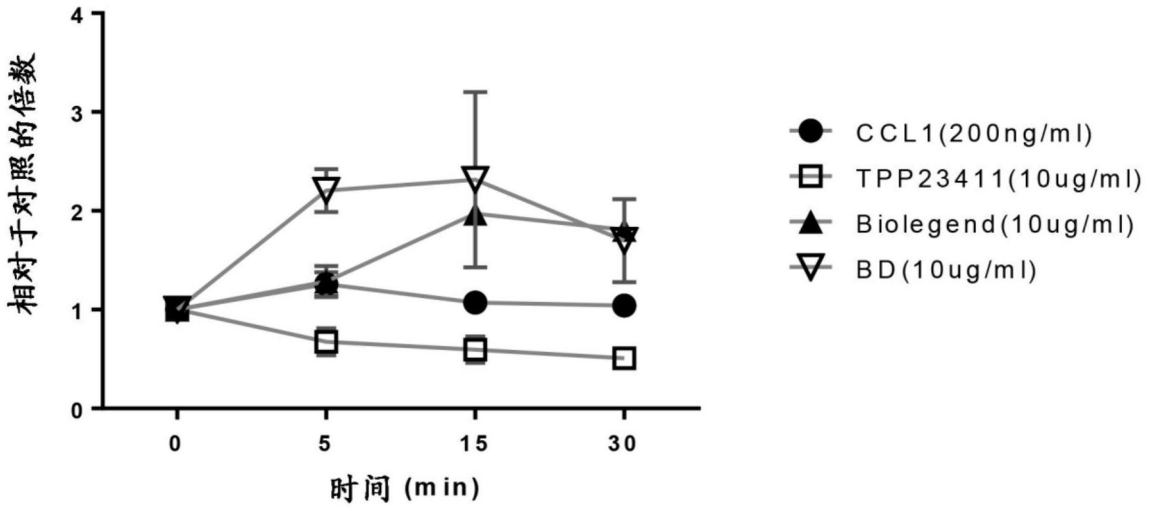

相对于对照的倍数
4
3
2
1
0
0
5
15
30
时间 (min)
CCL1(200ng/ml)
TPP23411(10ug/ml)
Biolegend(10ug/ml)
BD(10ug/ml)

图28

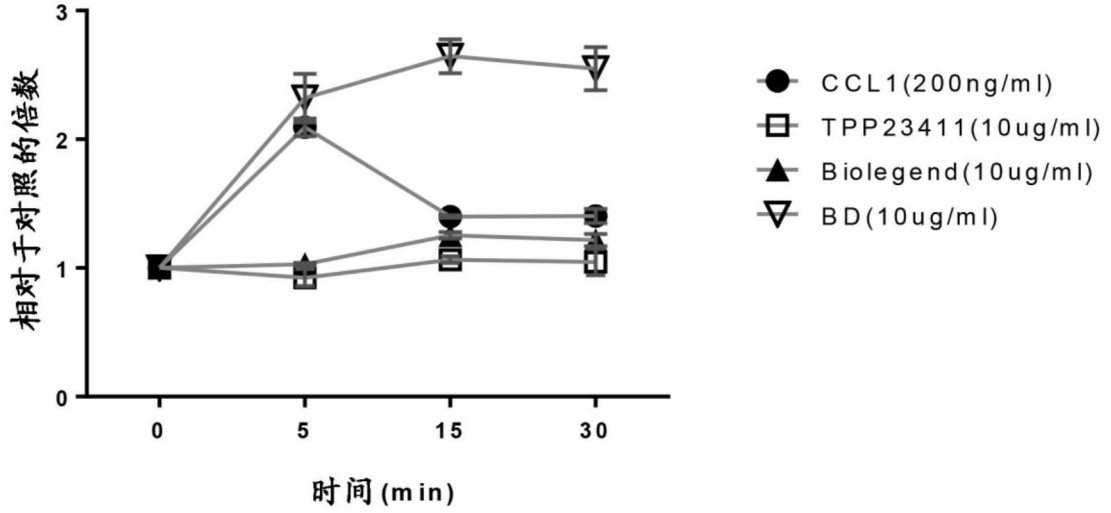

相对于对照的倍数
3
2
1
0
0
5
15
30
时间 (min)
CCL1(200ng/ml)
TPP23411(10ug/ml)
Biolegend(10ug/ml)
BD(10ug/ml)

图29

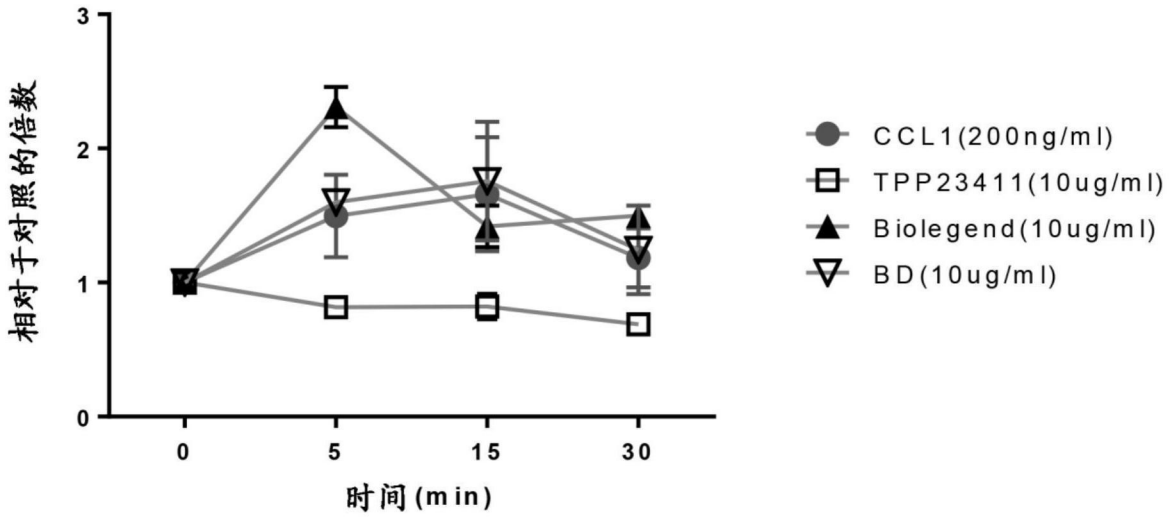

相对于对照的倍数
3
2
1
0
0
5
15
30
时间(min)
CCL1(200ng/ml)
TPP23411(10ug/ml)
Biolegend(10ug/ml)
BD(10ug/ml)

图30

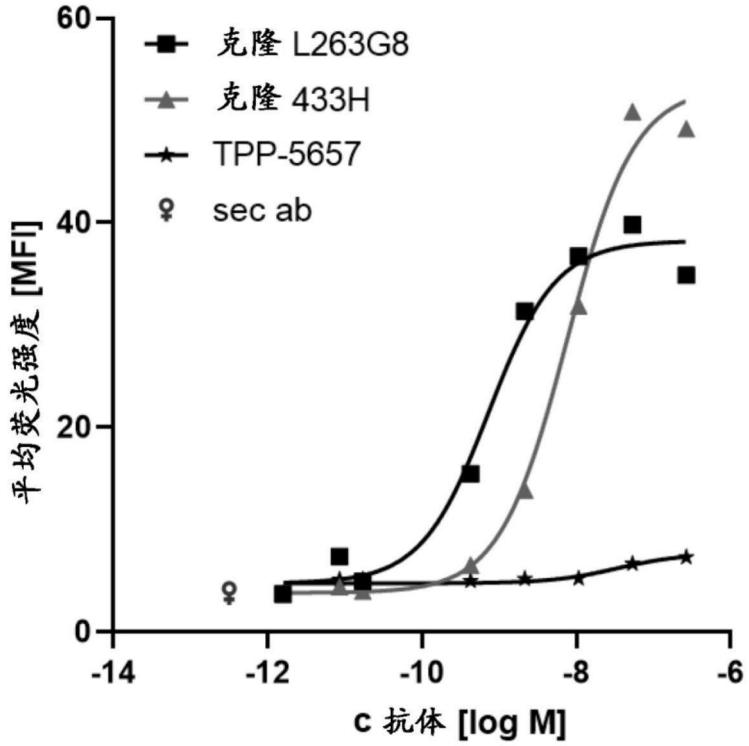

60
40
20
0
平均荧光强度 [MFI]
克隆 L263G8
克隆 433H
TPP-5657
sec ab
-14
-12
-10
-8
-6
c 抗体 [log M]

图31a

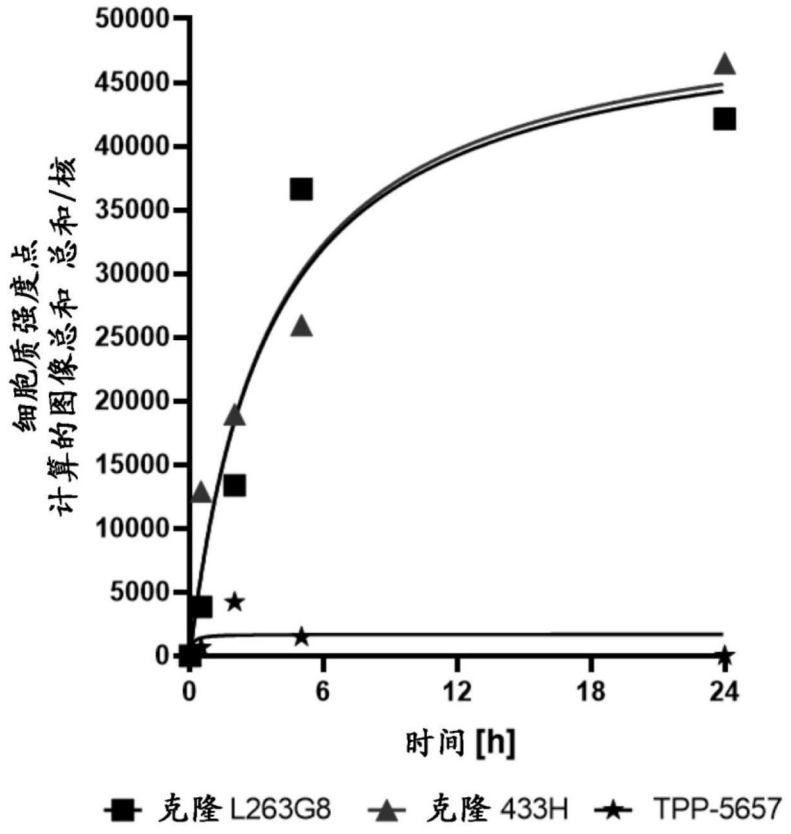

细胞质强度点
计算的图像总和 总和/核
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
6
12
18
24
时间 [h]
克隆 L263G8
克隆 433H
TPP-5657

图31b

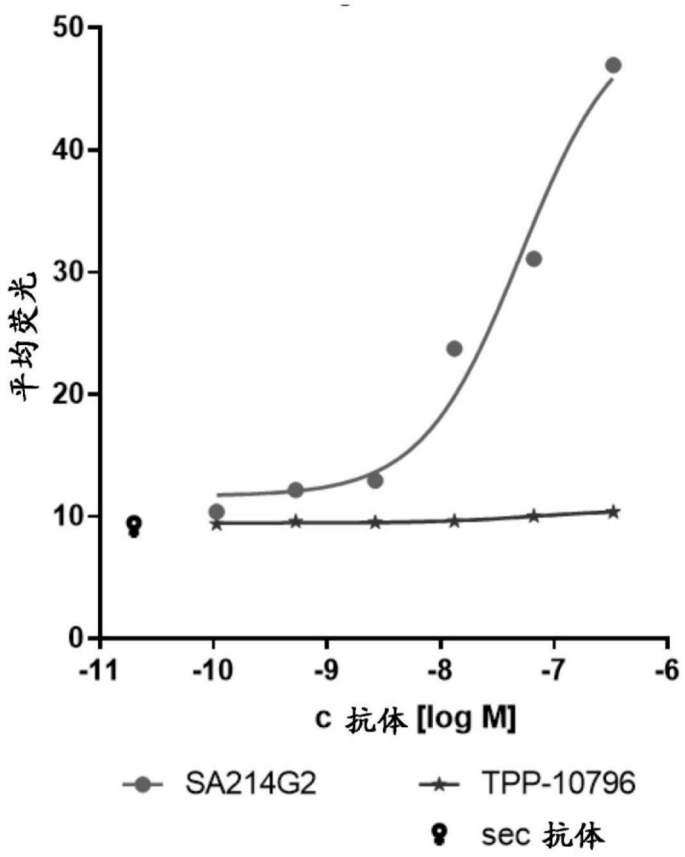

50
40
30
20
10
0
平均荧光
-11
-10
-9
-8
-7
-6
c 抗体 [log M]
SA214G2
TPP-10796
sec 抗体

图32a

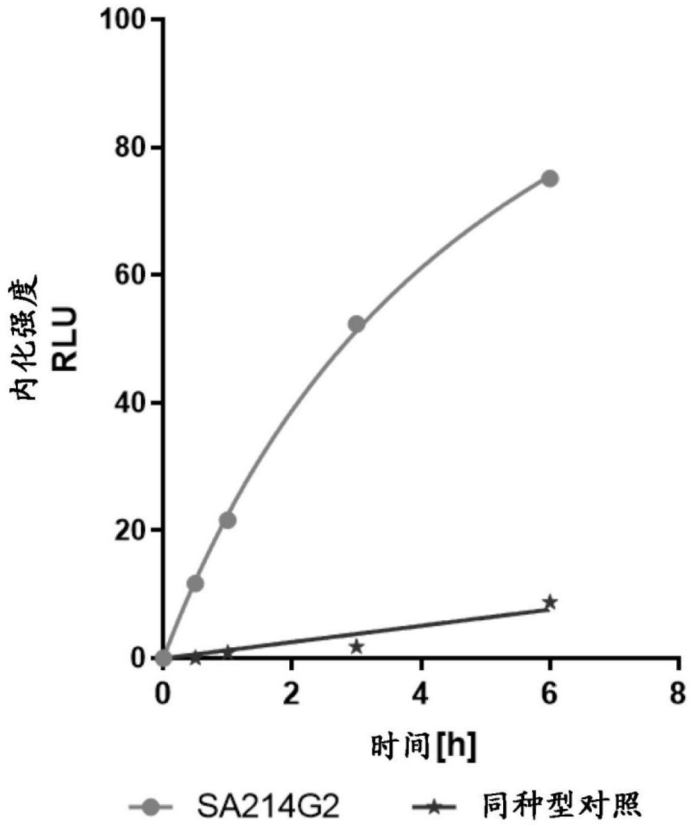

100
80
60
40
20
0
内化强度
RLU
0
2
4
6
8
时间[h]
SA214G2
同种型对照

图32b

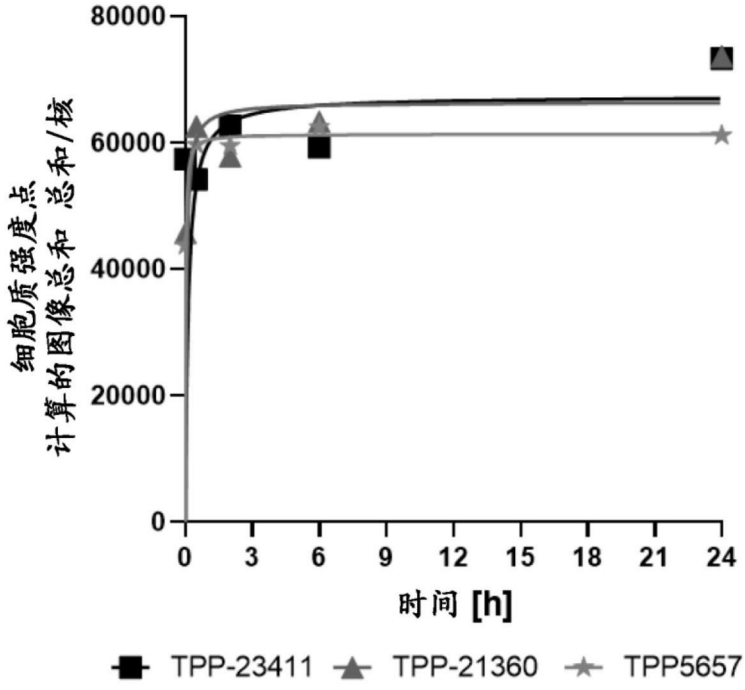

80000
60000
40000
20000
0
细胞质强度点
计算的图像总和 总和/核
0
3
6
9
12
15
18
21
24
时间 [h]
TPP-23411
TPP-21360
TPP5657

图33a

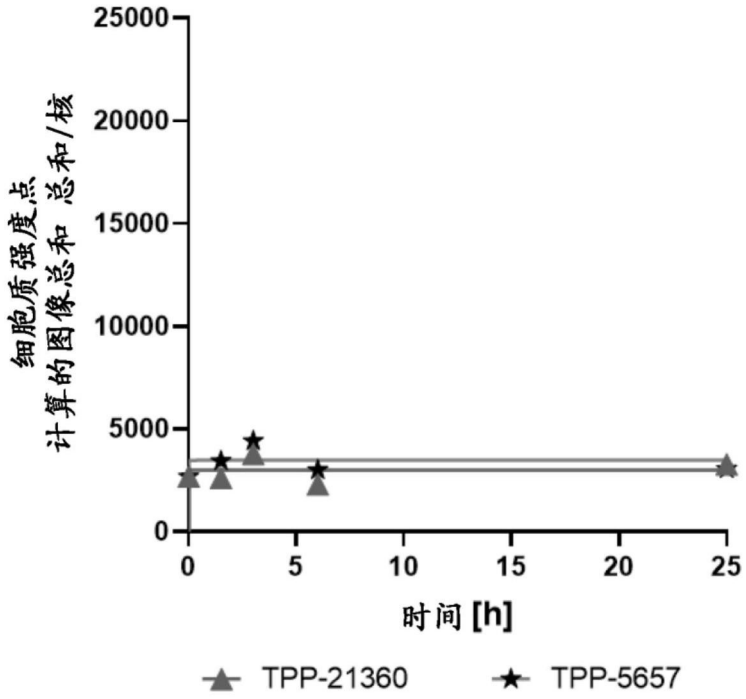

细胞质强度.点
计算的图像总和 总和/核
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
5
10
15
20
25
时间 [h]
TPP-21360
TPP-5657

图33b

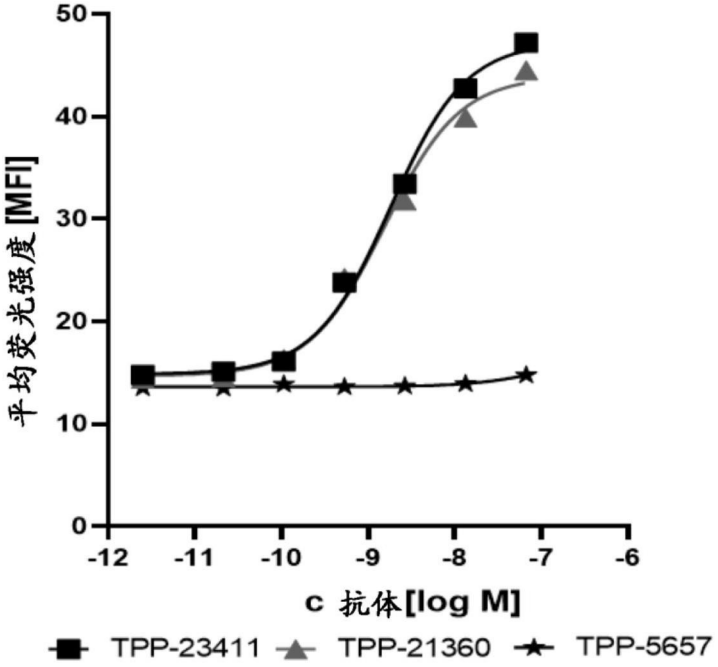

平均荧光强度 [MFI]
50
40
30
20
10
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
c 抗体[log M]
TPP-23411
TPP-21360
TPP-5657

图34a

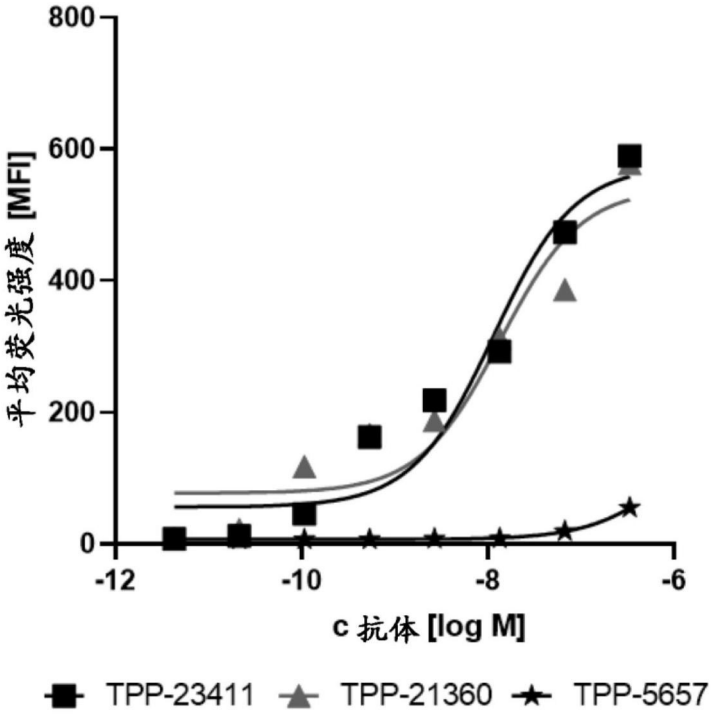

800
600
400
200
0
平均荧光强度 [MFI]
-12
-10
-8
-6
c 抗体 [log M]
TPP-23411
TPP-21360
TPP-5657

图34b

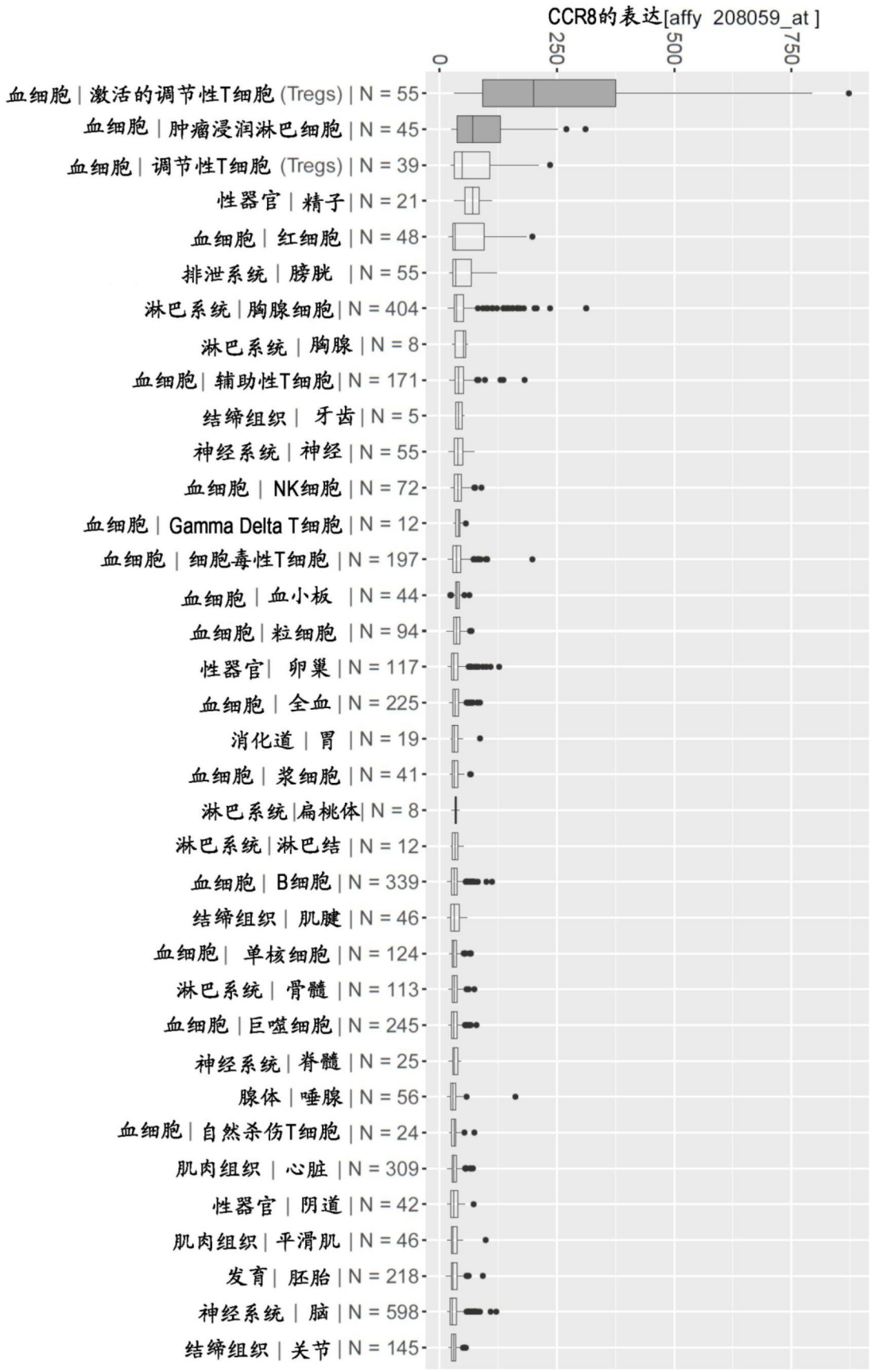

CCR8的表达[affy 208059_at]
0
250
500
750
血细胞 | 激活的调节性T细胞 (Tregs) | N = 55
血细胞 | 肿瘤浸润淋巴细胞 | N = 45
血细胞 | 调节性T细胞 (Tregs) | N = 39
性器官 | 精子 | N = 21
血细胞 | 红细胞 | N = 48
排泄系统 | 膀胱 | N = 55
淋巴系统 | 胸腺细胞 | N = 404
淋巴系统 | 胸腺 | N = 8
血细胞 | 辅助性T细胞 | N = 171
结缔组织 | 牙齿 | N = 5
神经系统 | 神经 | N = 55
血细胞 | NK细胞 | N = 72
血细胞 | Gamma Delta T细胞 | N = 12
血细胞 | 细胞毒性T细胞 | N = 197
血细胞 | 血小板 | N = 44
血细胞 | 粒细胞 | N = 94
性器官 | 卵巢 | N = 117
血细胞 | 全血 | N = 225
消化道 | 胃 | N = 19
血细胞 | 浆细胞 | N = 41
淋巴系统 | 扁桃体 | N = 8
淋巴系统 | 淋巴结 | N = 12
血细胞 | B细胞 | N = 339
结缔组织 | 肌腱 | N = 46
血细胞 | 单核细胞 | N = 124
淋巴系统 | 骨髓 | N = 113
血细胞 | 巨噬细胞 | N = 245
神经系统 | 脊髓 | N = 25
腺体 | 唾腺 | N = 56
血细胞 | 自然杀伤T细胞 | N = 24
肌肉组织 | 心脏 | N = 309
性器官 | 阴道 | N = 42
肌肉组织 | 平滑肌 | N = 46
发育 | 胚胎 | N = 218
神经系统 | 脑 | N = 598
结缔组织 | 关节 | N = 145

图35

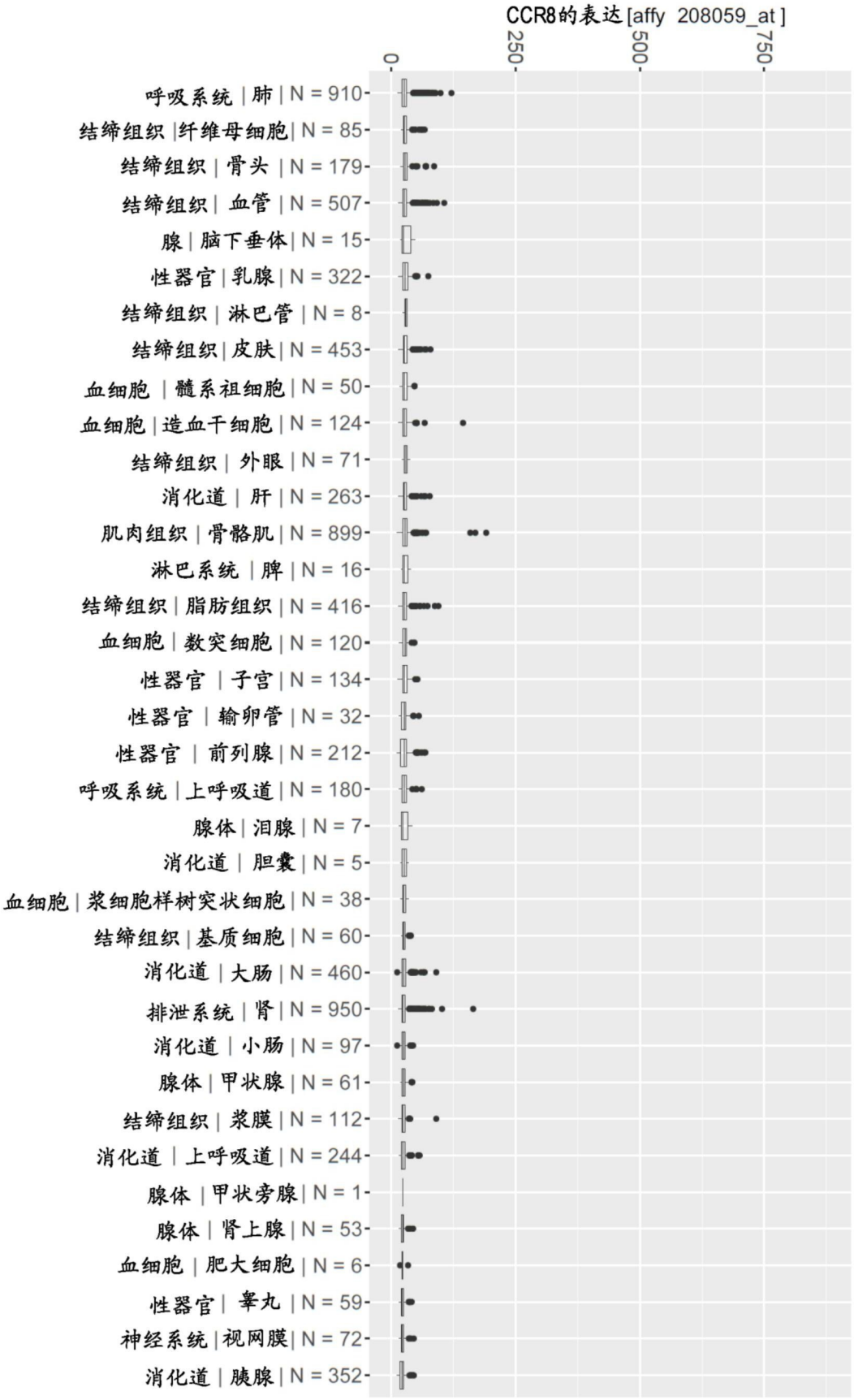

CCR8的表达[affy 208059_at]
0
250
500
750
呼吸系统 | 肺 | N = 910
结缔组织 |纤维母细胞| N = 85
结缔组织 | 骨头 | N = 179
结缔组织 | 血管 | N = 507
腺 | 脑下垂体 | N = 15
性器官 | 乳腺 | N = 322
结缔组织 | 淋巴管 | N = 8
结缔组织 | 皮肤 | N = 453
血细胞 | 髓系祖细胞 | N = 50
血细胞 | 造血干细胞 | N = 124
结缔组织 | 外眼 | N = 71
消化道 | 肝 | N = 263
肌肉组织 | 骨骼肌 | N = 899
淋巴系统 | 脾 | N = 16
结缔组织 | 脂肪组织 | N = 416
血细胞 | 数突细胞 | N = 120
性器官 | 子宫 | N = 134
性器官 | 输卵管 | N = 32
性器官 | 前列腺 | N = 212
呼吸系统 | 上呼吸道 | N = 180
腺体 | 泪腺 | N = 7
消化道 | 胆囊 | N = 5
血细胞 | 浆细胞样树突状细胞 | N = 38
结缔组织 | 基质细胞 | N = 60
消化道 | 大肠 | N = 460
排泄系统 | 肾 | N = 950
消化道 | 小肠 | N = 97
腺体 | 甲状腺 | N = 61
结缔组织 | 浆膜 | N = 112
消化道 | 上呼吸道 | N = 244
腺体 | 甲状旁腺 | N = 1
腺体 | 肾上腺 | N = 53
血细胞 | 肥大细胞 | N = 6
性器官 | 睾丸 | N = 59
神经系统 | 视网膜 | N = 72
消化道 | 胰腺 | N = 352

图35(续)

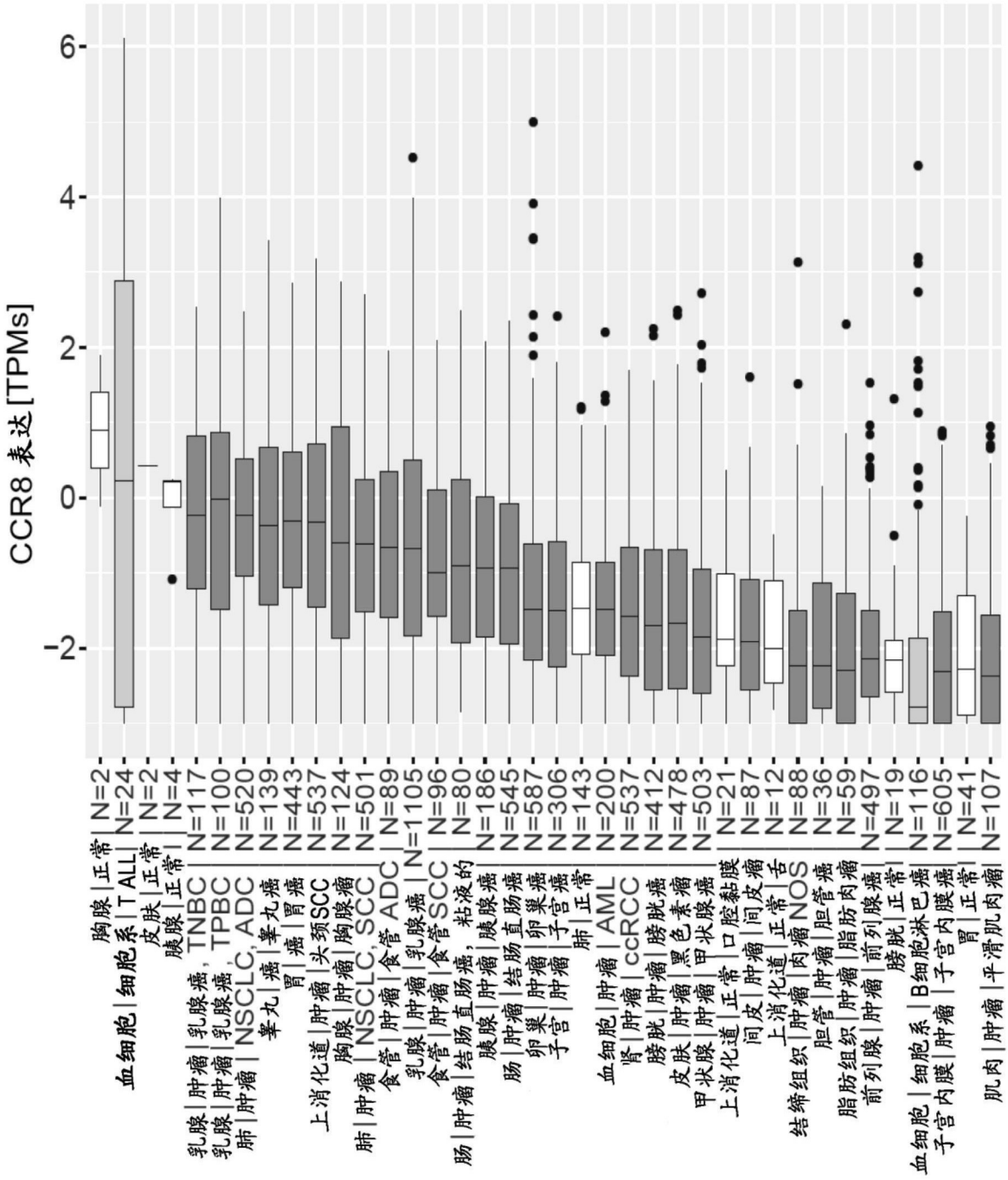

CCR8 表达 [TPMs]
6
4
2
0
-2
胸腺 | 正常 | N=2
血细胞 | 细胞系 | T ALL | N=24
皮肤 | 正常 | N=2
胰腺 | 正常 | | N=4
乳腺 | 肿瘤 | 乳腺癌, TNBC | N=117
乳腺 | 肿瘤 | 乳腺癌, TPBC | N=100
肺 | 肿瘤 | NSCLC, ADC | N=520
睾丸 | 癌 | 睾丸癌 | N=139
胃 | 癌 | 胃癌 | N=443
上消化道 | 肿瘤 | 头颈SCC | N=537
胸腺 | 肿瘤 | 胸腺瘤 | N=124
肺 | 肿瘤 | NSCLC, SCC | N=501
食管 | 肿瘤 | 食管 ADC | N=89
乳腺 | 肿瘤 | 乳腺癌 | N=1105
食管 | 肿瘤 | 食管SCC | N=96
肠 | 肿瘤 | 结肠直肠癌，粘液的 | N=80
胰腺 | 肿瘤 | 胰腺癌 | N=186
肠 | 肿瘤 | 结肠直肠癌 | N=545
卵巢 | 肿瘤 | 卵巢癌 | N=587
子宫 | 肿瘤 | 子宫癌 | N=306
肺 | 正常 | N=143
血细胞 | 肿瘤 | AML | N=200
肾 | 肿瘤 | ccRCC | N=537
膀胱 | 肿瘤 | 膀胱癌 | N=412
皮肤 | 肿瘤 | 黑色素瘤 | N=478
甲状腺 | 肿瘤 | 甲状腺癌 | N=503
上消化道 | 正常 | 口腔黏膜 | N=21
间皮 | 肿瘤 | 间皮瘤 | N=87
上消化道 | 正常 | 舌 | N=12
结缔组织 | 肿瘤 | 肉瘤 NOS | N=88
胆管 | 肿瘤 | 胆管癌 | N=36
脂肪组织 | 肿瘤 | 脂肪肉瘤 | N=59
前列腺 | 肿瘤 | 前列腺癌 | N=497
膀胱 | 正常 | N=19
血细胞 | 细胞系 | B细胞淋巴瘤 | N=116
子宫内膜 | 肿瘤 | 子宫内膜癌 | N=605
胃 | 正常 | N=41
肌肉 | 肿瘤 | 平滑肌肉瘤 | N=107

图36

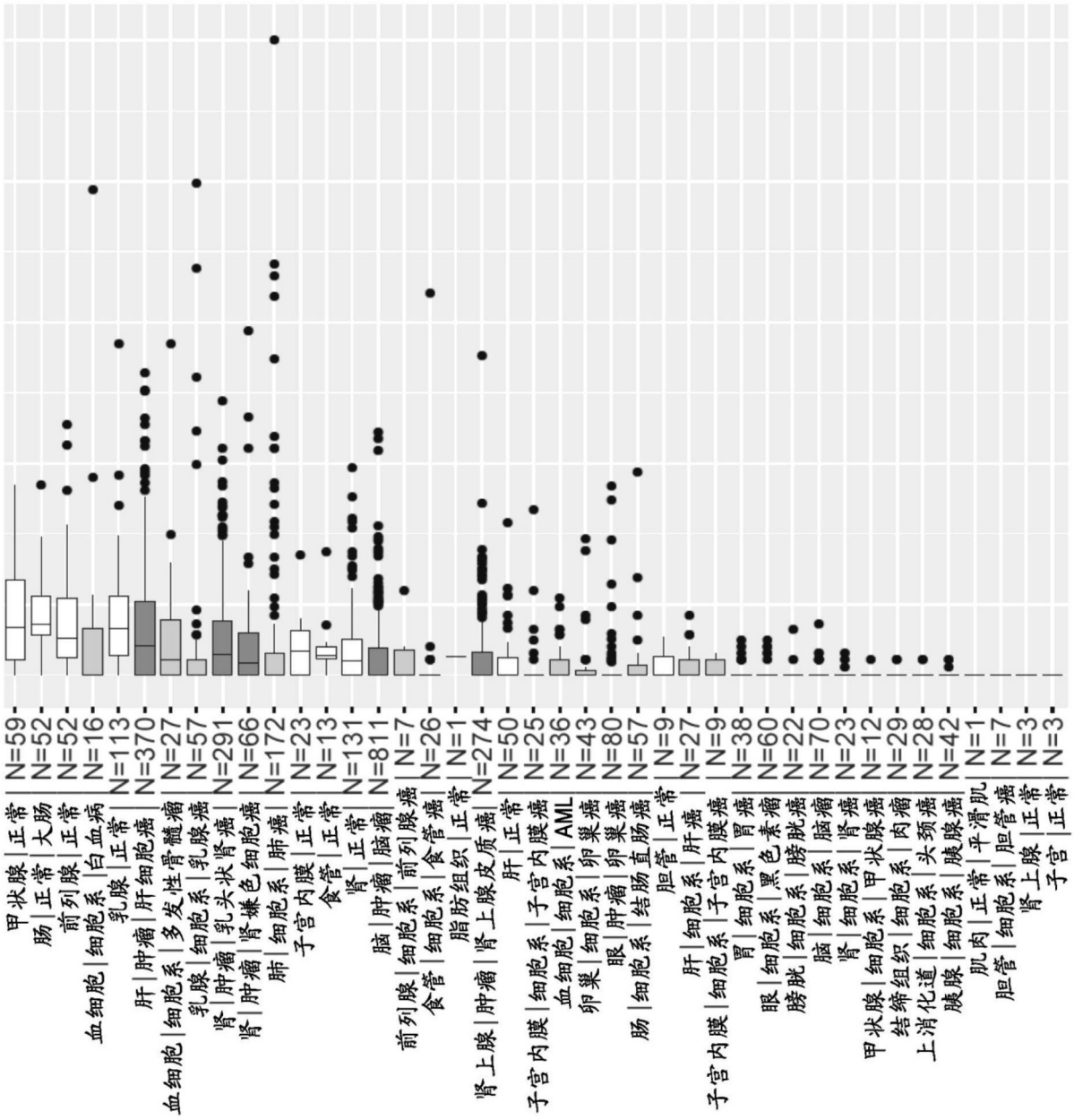

甲状腺|正常 N=59
肠|正常|大肠 N=52
前列腺|正常 N=52
血细胞|细胞系|白血病 N=16
乳腺|正常 N=113
肝|肿瘤|肝细胞癌 N=370
血细胞|细胞系|多发性骨髓瘤 N=27
乳腺|细胞系|乳腺癌 N=57
肾|肿瘤|乳头状肾癌 N=291
肾|肿瘤|肾嫌色细胞癌 N=66
肺|细胞系|肺癌 N=172
子宫内膜|正常 N=23
食管|正常 N=13
肾|正常 N=131
脑|肿瘤|脑瘤 N=811
前列腺|细胞系|前列腺癌 N=7
食管|细胞系|食管癌 N=26
脂肪组织|正常 N=1
肾上腺|肿瘤|肾上腺皮质癌 N=274
肝|正常 N=50
子宫内膜|细胞系|子宫内膜癌 N=25
血细胞|细胞系|AML N=36
卵巢|细胞系|卵巢癌 N=43
眼|肿瘤|卵巢癌 N=80
肠|细胞系|结肠直肠癌 N=57
胆管|正常 N=9
肝|细胞系|肝癌 N=27
子宫内膜|细胞系|子宫内膜癌 N=9
胃|细胞系|胃癌 N=38
眼|细胞系|黑色素瘤 N=60
膀胱|细胞系|膀胱癌 N=22
脑|细胞系|脑瘤 N=70
肾|细胞系|肾癌 N=23
甲状腺|细胞系|甲状腺癌 N=12
结缔组织|细胞系|肉瘤 N=29
上消化道|细胞系|头颈癌 N=28
胰腺|细胞系|胰腺癌 N=42
肌肉|正常|平滑肌 N=1
胆管|细胞系|胆管癌 N=7
肾上腺|正常 N=3
子宫|正常 N=3

图36(续)

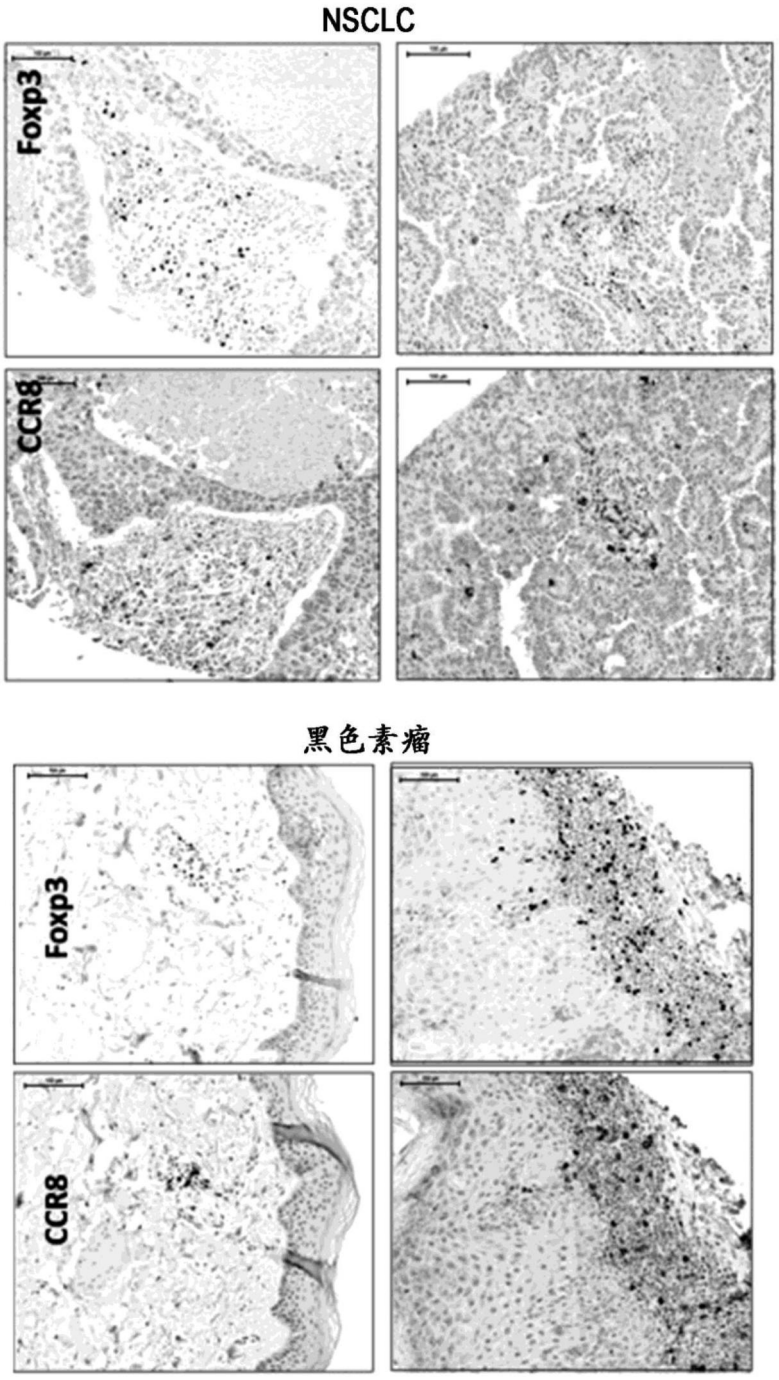


图37

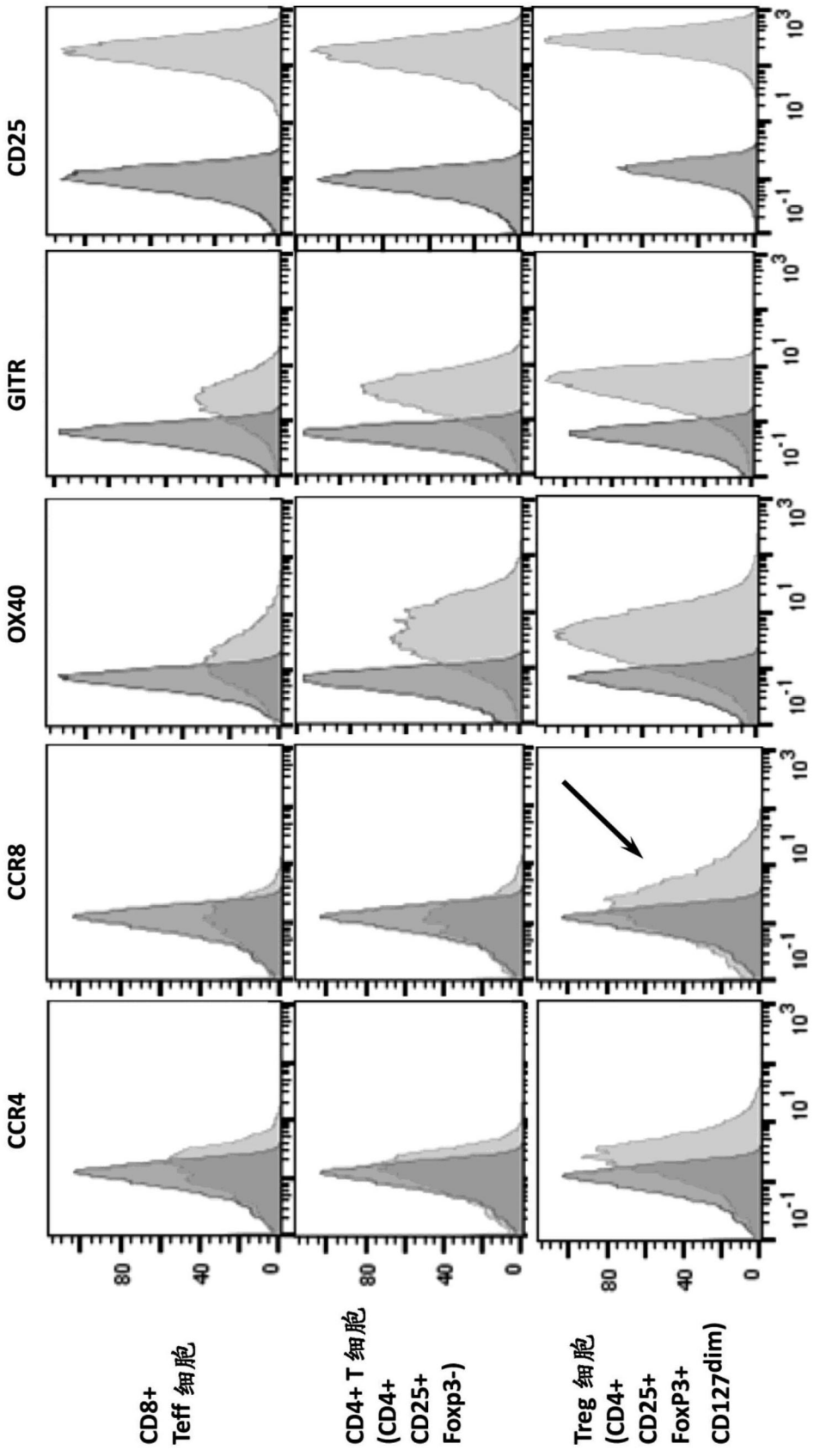

CCR4
CCR8
OX40
GITR
CD25
CD8+ Teff 细胞
CD4+ T 细胞 (CD4+ CD25+ Foxp3-)
Treg 细胞 (CD4+ CD25+ FoxP3+ CD127dim)
0
40
80
10-1
101
103

图38

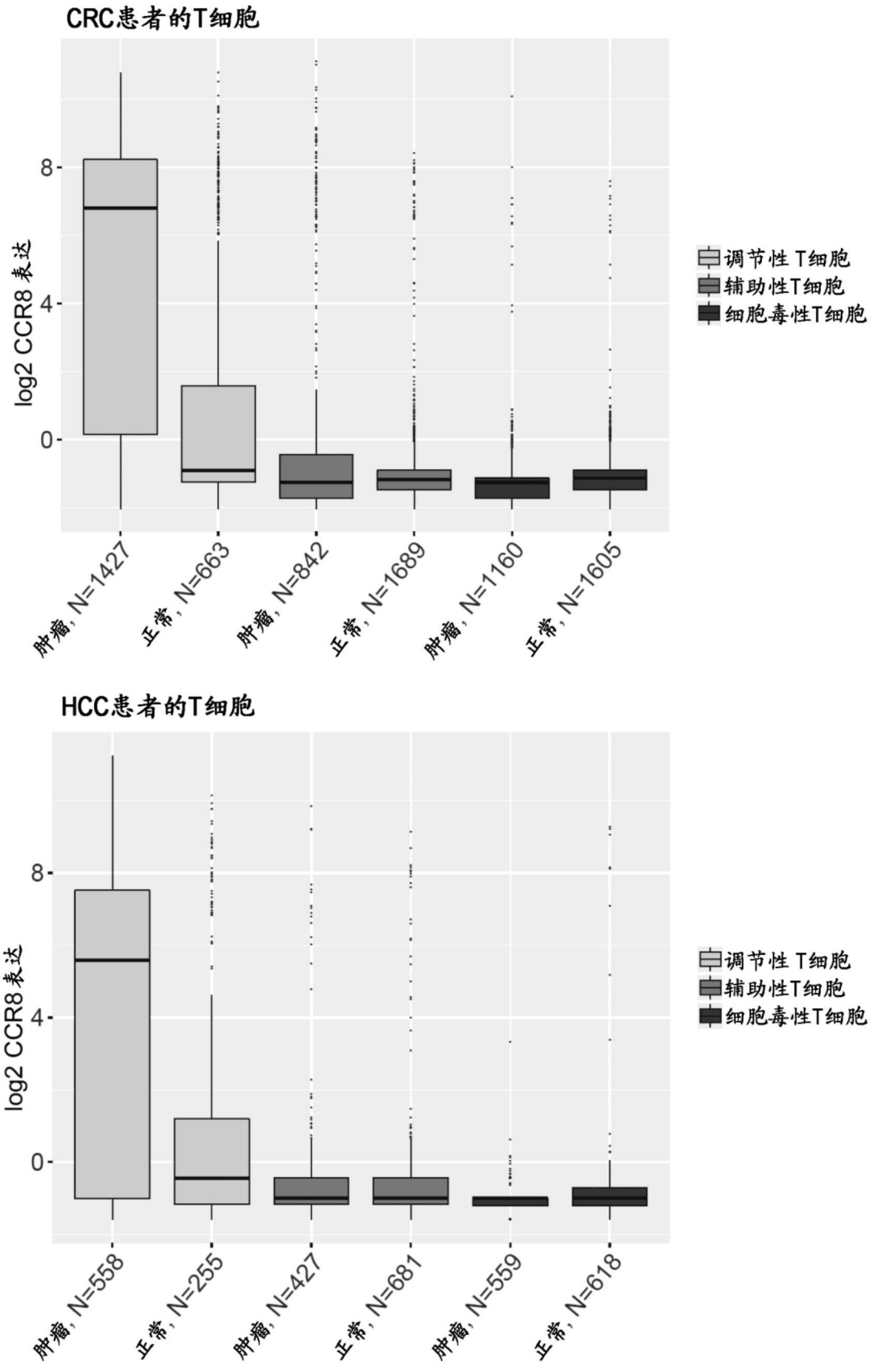

CRC患者的T细胞
log2 CCR8 表达
8
4
0
肿瘤, N=1427
正常, N=663
肿瘤, N=842
正常, N=1689
肿瘤, N=1160
正常, N=1605
调节性 T细胞
辅助性T细胞
细胞毒性T细胞
HCC患者的T细胞
log2 CCR8 表达
8
4
0
肿瘤, N=558
正常, N=255
肿瘤, N=427
正常, N=681
肿瘤, N=559
正常, N=618
调节性 T细胞
辅助性T细胞
细胞毒性T细胞

图39

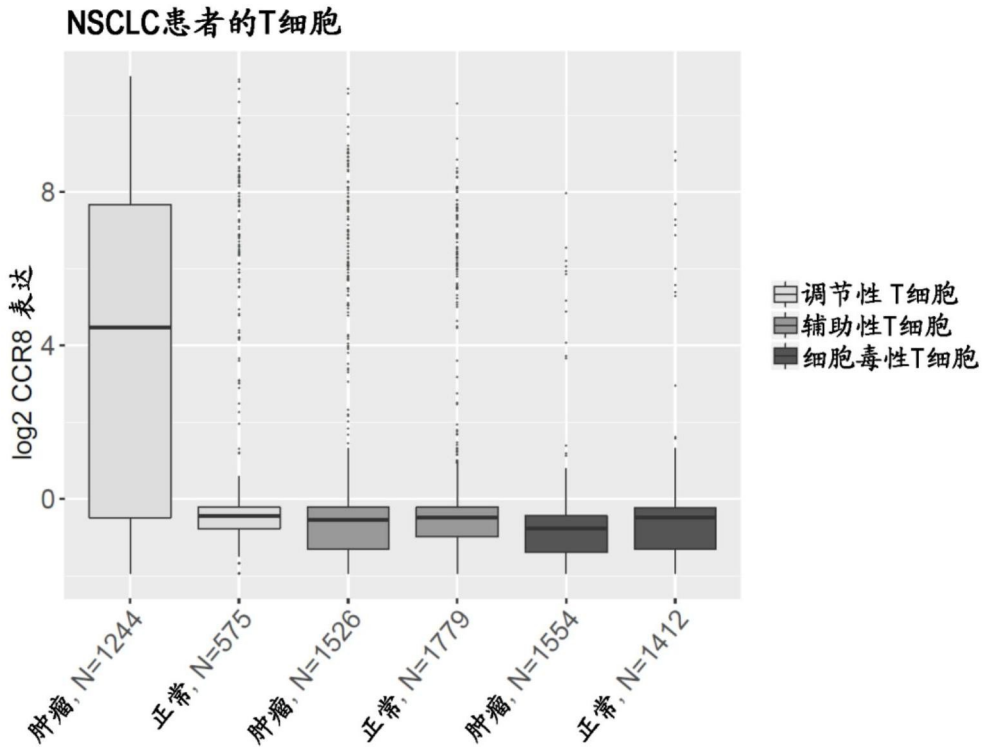

NSCLC患者的T细胞
log2 CCR8 表达
8
4
0
肿瘤, N=1244
正常, N=575
肿瘤, N=1526
正常, N=1779
肿瘤, N=1554
正常, N=1412
调节性 T细胞
辅助性T细胞
细胞毒性T细胞

图39(续)

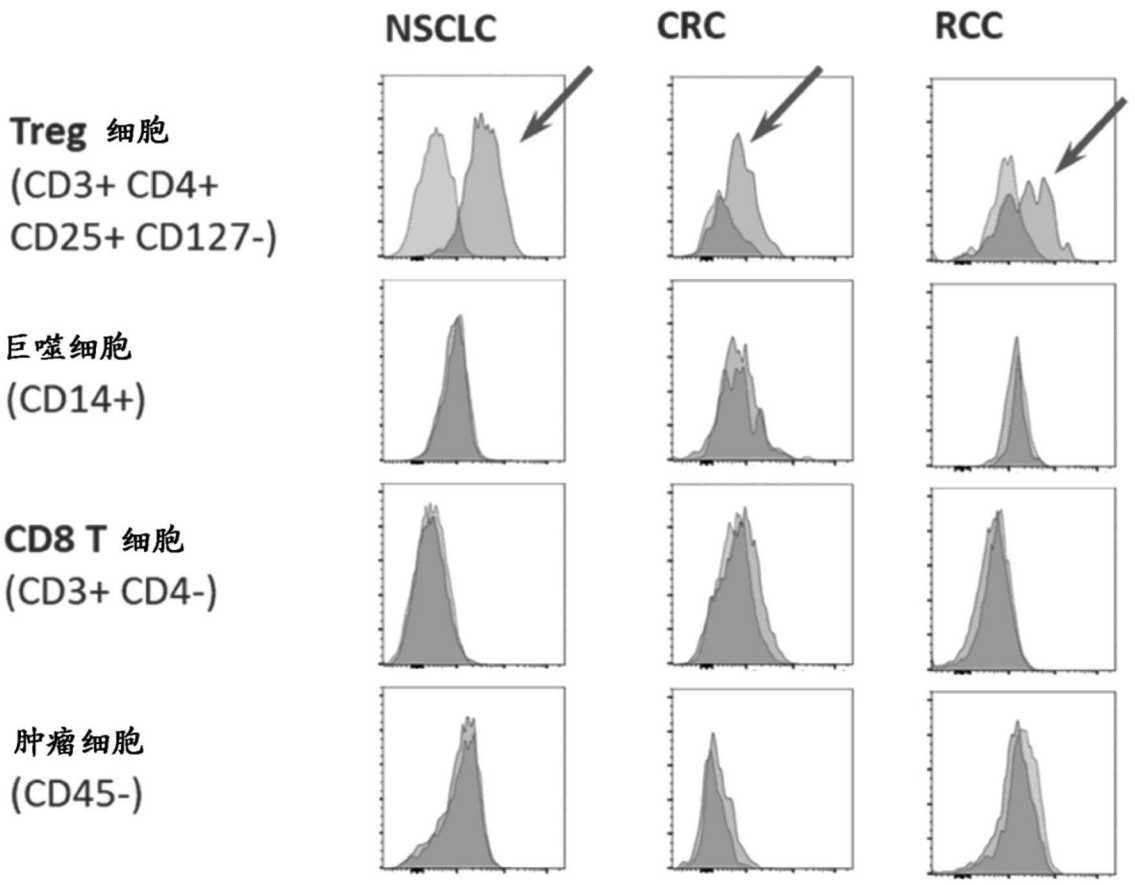

NSCLC
CRC
RCC
Treg 细胞
(CD3+ CD4+
CD25+ CD127-)
巨噬细胞
(CD14+)
CD8 T 细胞
(CD3+ CD4-)
肿瘤细胞
(CD45-)

图40

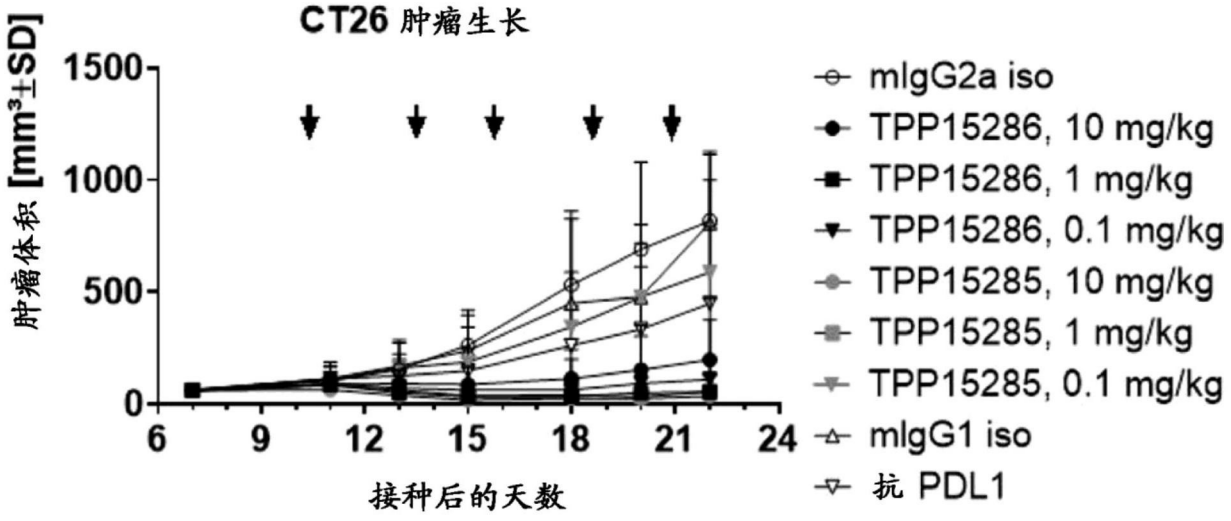

CT26 肿瘤生长
肿瘤体积 [mm³±SD]
1500
1000
500
0
6
9
12
15
18
21
24
接种后的天数
mIgG2a iso
TPP15286, 10 mg/kg
TPP15286, 1 mg/kg
TPP15286, 0.1 mg/kg
TPP15285, 10 mg/kg
TPP15285, 1 mg/kg
TPP15285, 0.1 mg/kg
mIgG1 iso
抗 PDL1

图41

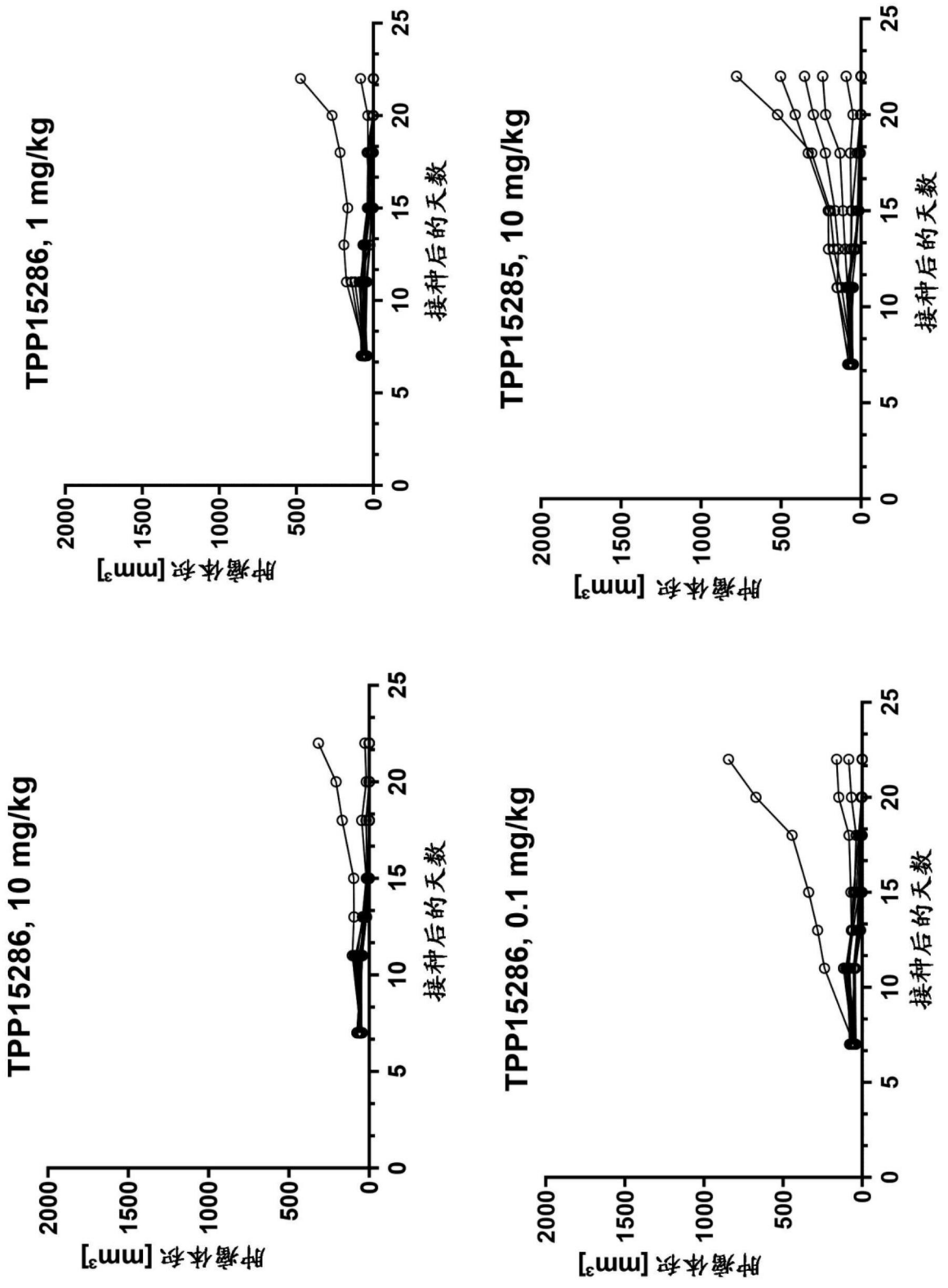

TPP15286, 1 mg/kg
TPP15285, 10 mg/kg
TPP15286, 10 mg/kg
TPP15286, 0.1 mg/kg
肿瘤体积 [mm³]
接种后的天数
0
500
1000
1500
2000
0
5
10
15
20
25

图42

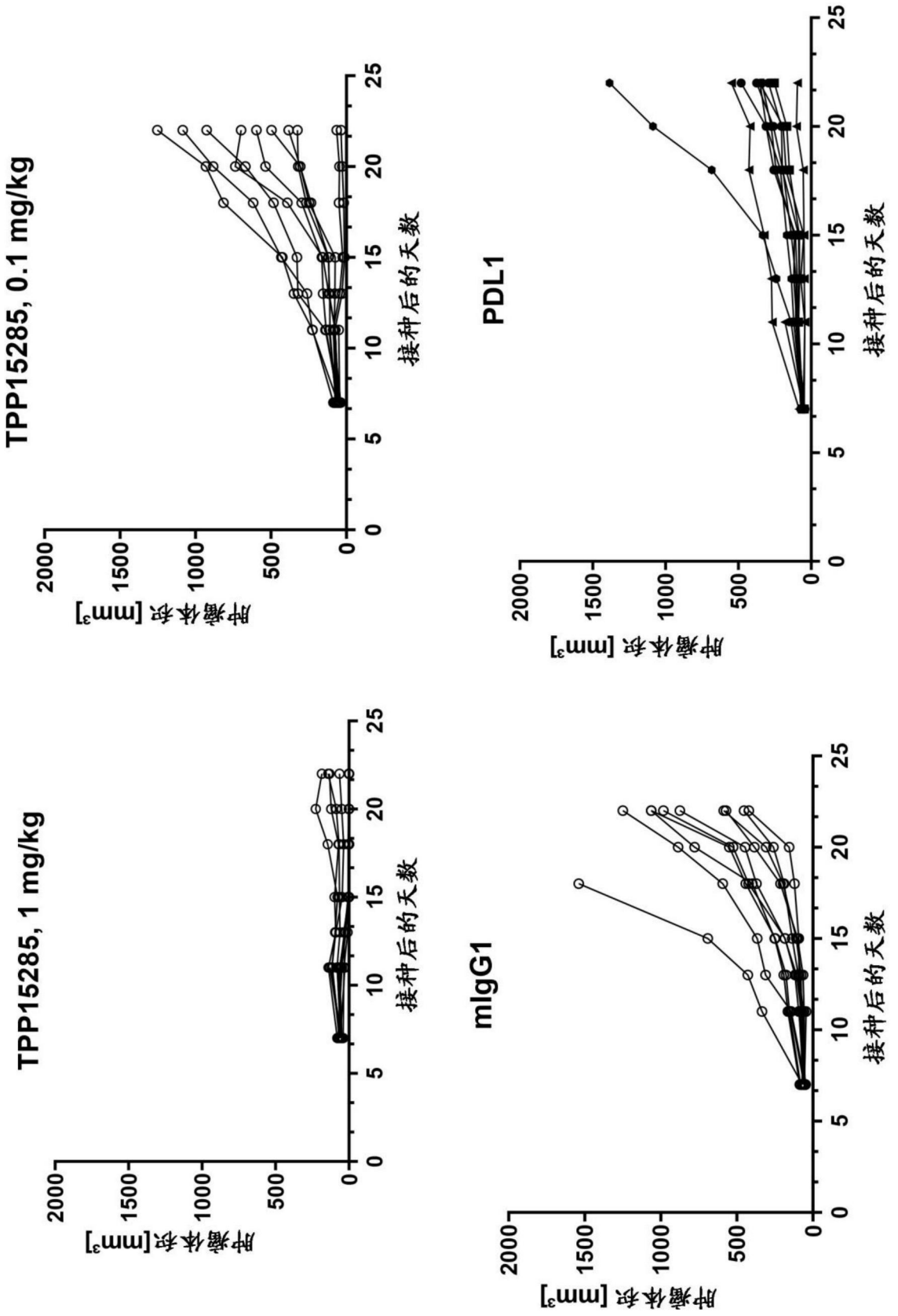

TPP15285, 0.1 mg/kg
PDL1
TPP15285, 1 mg/kg
mIgG1
肿瘤体积 [mm³]
接种后的天数
0
500
1000
1500
2000
0
5
10
15
20
25

图42(续)

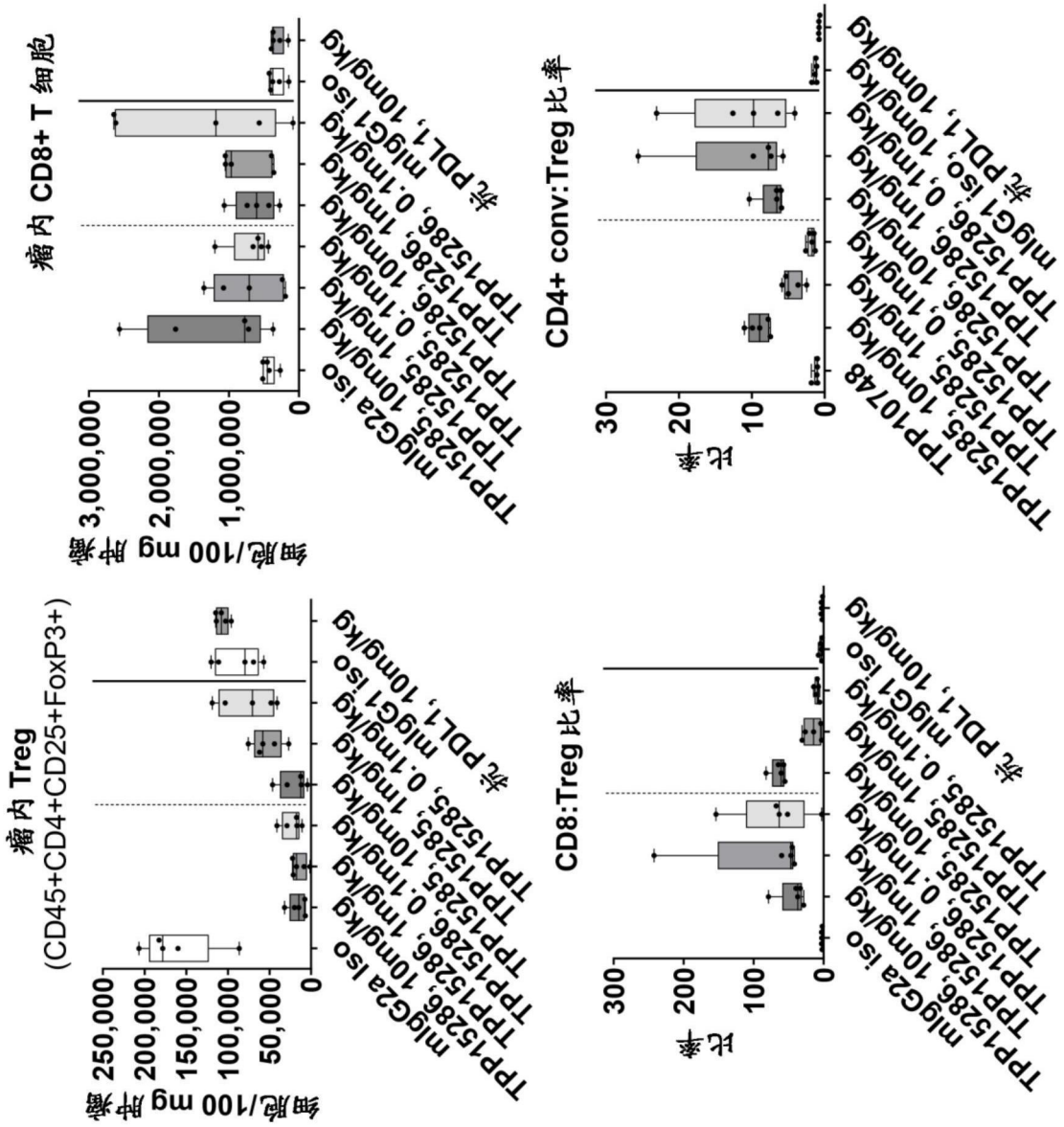

瘤内 CD8+ T 细胞
细胞/100 mg 肿瘤
3,000,000
2,000,000
1,000,000
0
mIgG2a iso
TPP15285, 10mg/kg
TPP15285, 0.1mg/kg
TPP15286, 10mg/kg
TPP15286, 0.1mg/kg
抗 PDL1, mIgG1 iso
CD4+ conv:Treg 比率
比率
30
20
10
0
TPP10748
TPP15285, 10mg/kg
TPP15285, 0.1mg/kg
TPP15286, 10mg/kg
TPP15286, 0.1mg/kg
mIgG1 iso, 10mg/kg
抗 PDL1, 10mg/kg
瘤内 Treg
(CD45+CD4+CD25+FoxP3+)
细胞/100 mg 肿瘤
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
CD8:Treg 比率
比率
300
200
100
0

图43

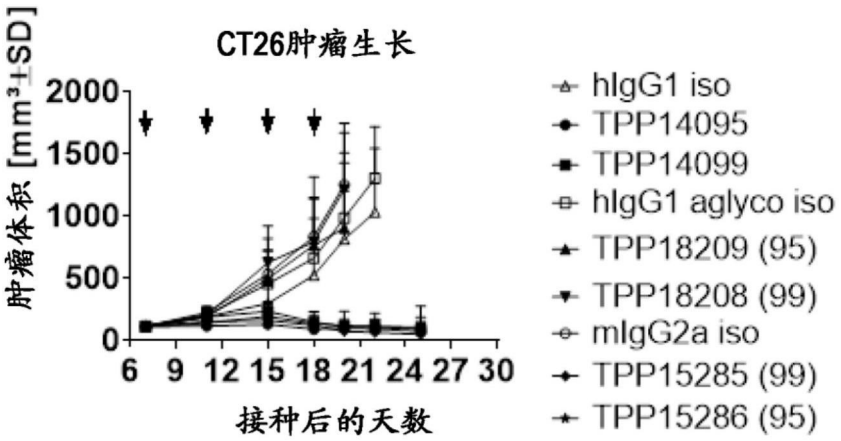

CT26肿瘤生长
肿瘤体积 [mm³±SD]
2000
1500
1000
500
0
6 9 12 15 18 21 24 27 30
接种后的天数
hIgG1 iso
TPP14095
TPP14099
hIgG1 aglyco iso
TPP18209 (95)
TPP18208 (99)
mIgG2a iso
TPP15285 (99)
TPP15286 (95)

图44

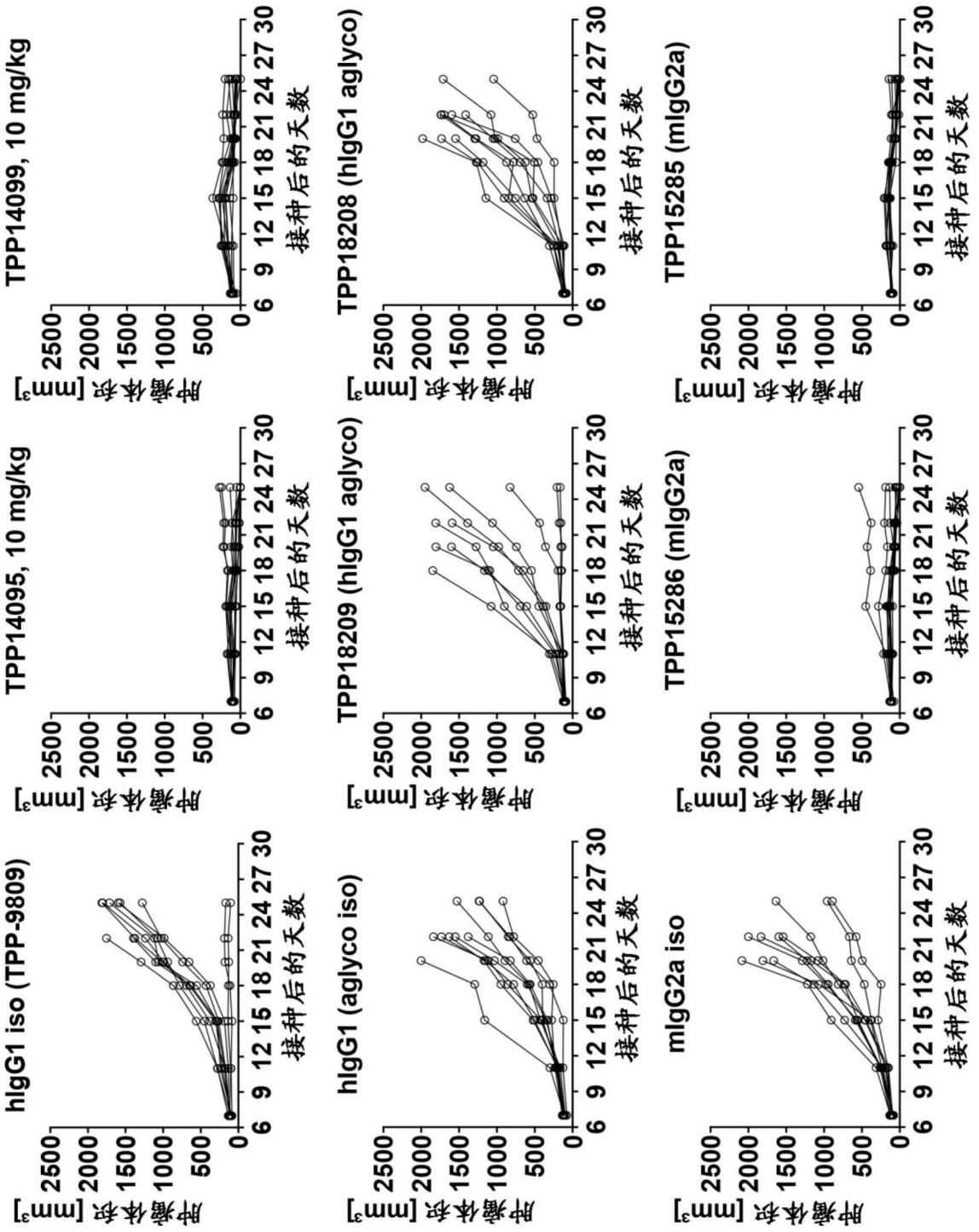

TPP14099, 10 mg/kg
TPP18208 (hIgG1 aglyco)
TPP15285 (mIgG2a)
TPP14095, 10 mg/kg
TPP18209 (hIgG1 aglyco)
TPP15286 (mIgG2a)
hIgG1 iso (TPP-9809)
hIgG1 (aglyco iso)
mIgG2a iso
肿瘤体积 [mm³]
接种后的天数
0
500
1000
1500
2000
2500
6 9 12 15 18 21 24 27 30

图45

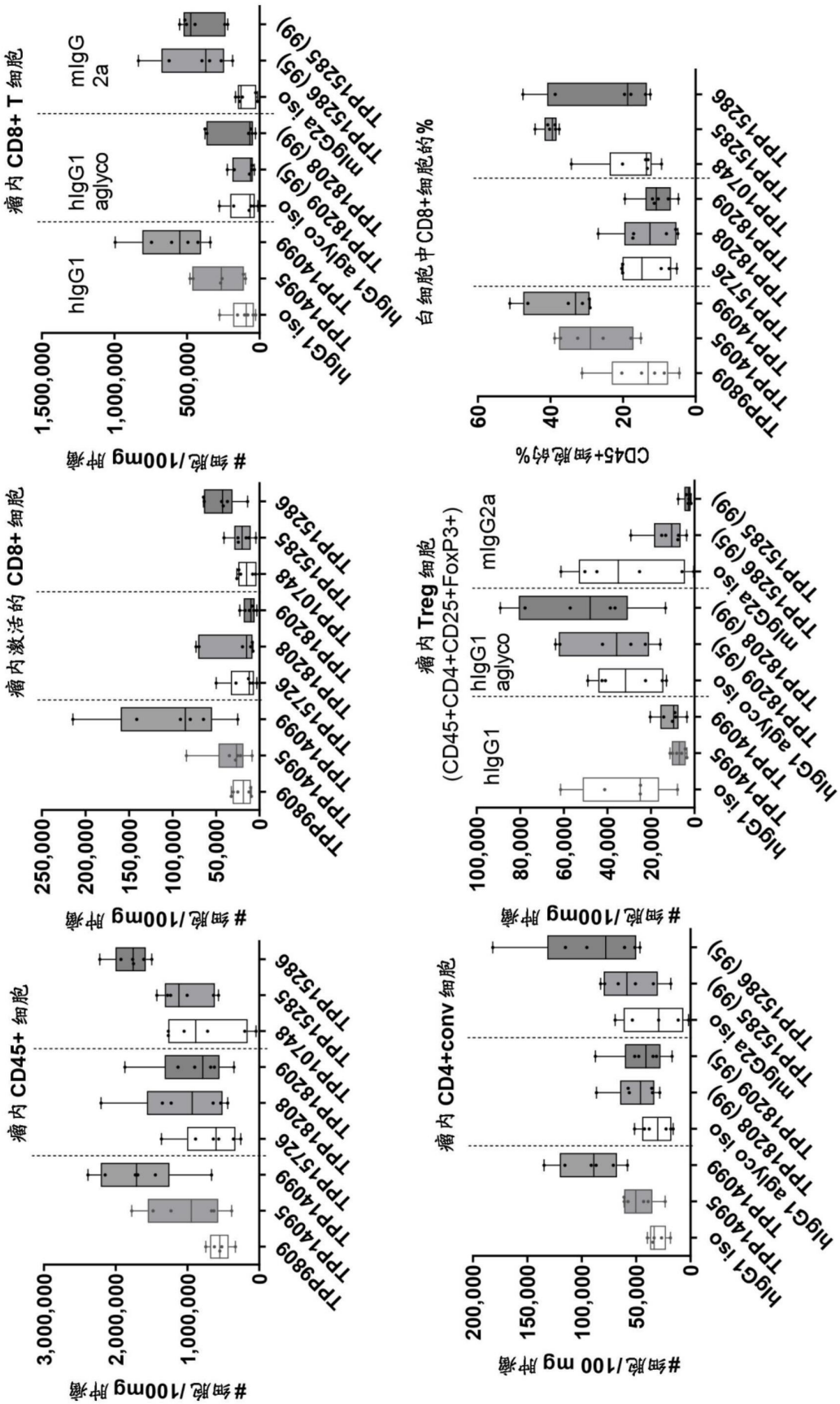

瘤内 CD8+ T 细胞
hIgG1
hIgG1 aglyco
mIgG 2a
细胞/100mg 肿瘤
1,500,000
1,000,000
500,000
0
hIgG1 iso
TPP14095
TPP14099
hIgG1 aglyco iso
TPP18209 (95)
mIgG2a iso
TPP15286 (95)
TPP15285 (99)
白细胞中 CD8+细胞的%
CD45+细胞的%
60
40
20
0
TPP9809
TPP14095
TPP14099
TPP15726
TPP18208
TPP18209
TPP1748
TPP15285
TPP15286
瘤内激活的 CD8+ 细胞
细胞/100mg 肿瘤
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
TPP9809
TPP14095
TPP14099
TPP15726
TPP18208
TPP18209
TPP1748
TPP15285
TPP15286
瘤内 Treg 细胞
(CD45+CD4+CD25+FoxP3+)
hIgG1
hIgG1 aglyco
mIgG2a
细胞/100mg 肿瘤
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
hIgG1 iso
TPP14095
TPP14099
hIgG1 aglyco iso
TPP18209 (95)
mIgG2a iso
TPP15286 (95)
TPP15285 (99)
瘤内 CD45+ 细胞
细胞/100mg 肿瘤
3,000,000
2,000,000
1,000,000
0
TPP9809
TPP14095
TPP14099
TPP15726
TPP18208
TPP18209
TPP1748
TPP15285
TPP15286
瘤内 CD4+conv 细胞
#细胞/100 mg 肿瘤
200,000
150,000
100,000
50,000
0
hIgG1 iso
TPP14095
TPP14099
hIgG1 aglyco iso
TPP18208 (99)
TPP18209 (95)
mIgG2a iso
TPP15285 (99)
TPP15286 (95)

图46

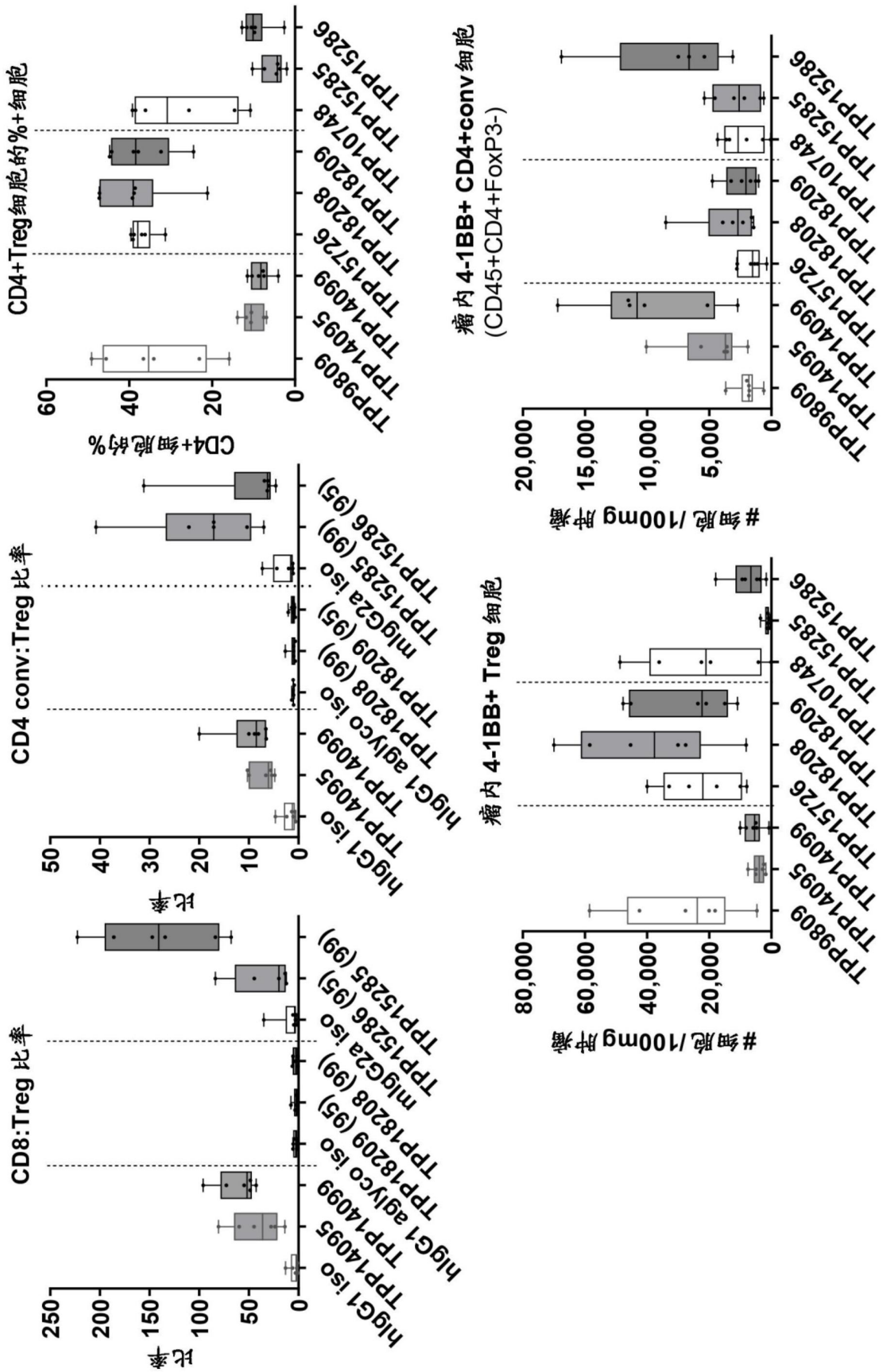

CD8:Treg 比率
比率
hIgG1 iso
TPP14095
TPP14099
hIgG1 aglyco iso
TPP18209 (95)
TPP18208 (99)
mIgG2a iso
TPP15286 (95)
TPP15285 (99)
CD4 conv:Treg 比率
比率
hIgG1 iso
TPP14095
TPP14099
hIgG1 aglyco iso
TPP18208 (99)
TPP18209 (95)
mIgG2a iso
TPP15285 (99)
TPP15286 (95)
CD4+Treg细胞的%+细胞
CD4+细胞的%
TPP9809
TPP14095
TPP14099
TPP15726
TPP18208
TPP18209
TPP10748
TPP15285
TPP15286
瘤内 4-1BB+ CD4+conv细胞
(CD45+CD4+FoxP3-)
细胞 /100mg 肿瘤
TPP9809
TPP14095
TPP14099
TPP15726
TPP18208
TPP18209
TPP10748
TPP15285
TPP15286
瘤内 4-1BB+ Treg 细胞
细胞 /100mg 肿瘤
TPP9809
TPP14095
TPP14099
TPP15726
TPP18208
TPP18209
TPP10748
TPP15285
TPP15286

图46(续)

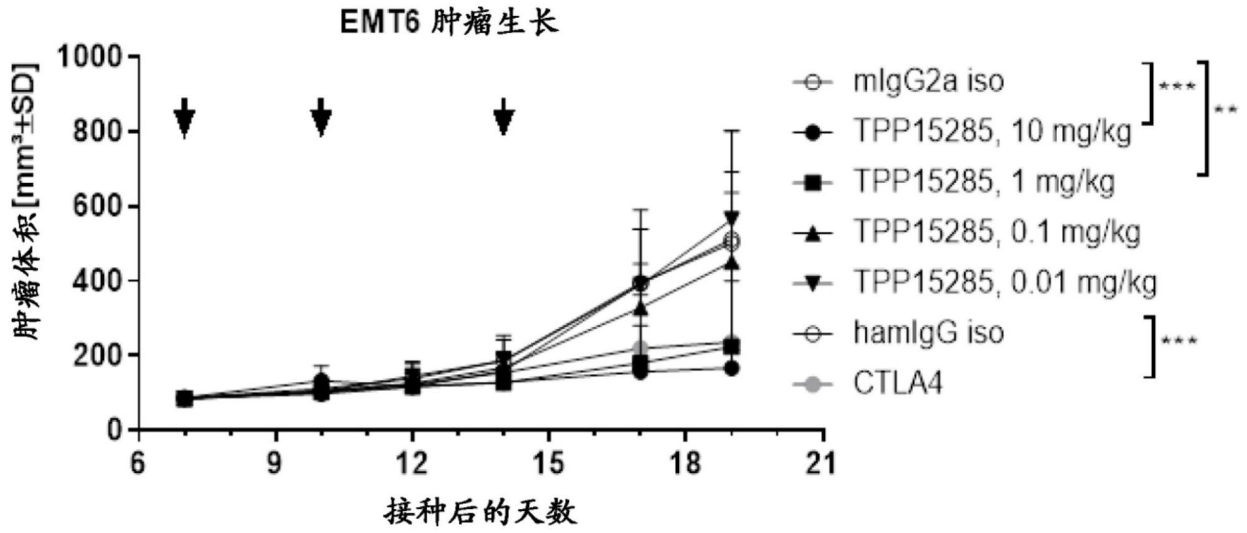

EMT6 肿瘤生长
肿瘤体积[mm³±SD]
1000
800
600
400
200
0
6
9
12
15
18
21
接种后的天数
mIgG2a iso
TPP15285, 10 mg/kg
TPP15285, 1 mg/kg
TPP15285, 0.1 mg/kg
TPP15285, 0.01 mg/kg
hamIgG iso
CTLA4
***
**
***

图47

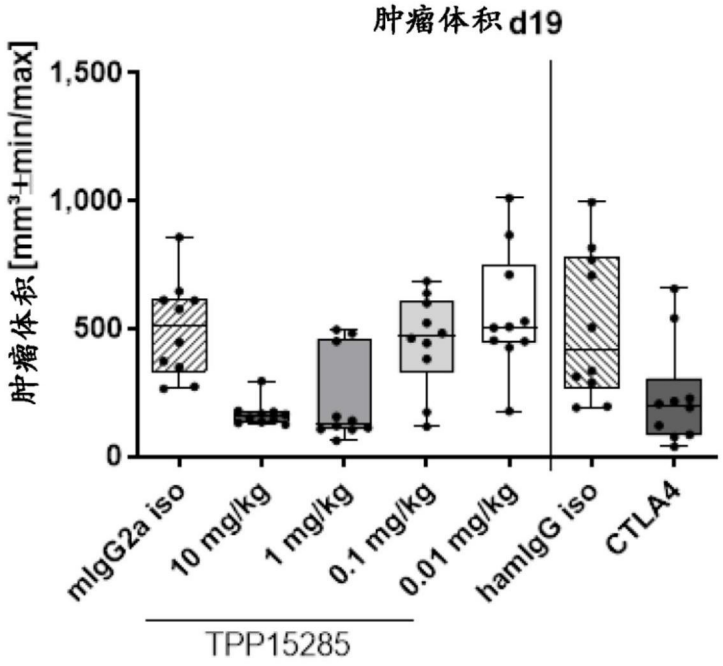

肿瘤体积 d19
肿瘤体积[mm³±min/max]
1,500
1,000
500
0
mIgG2a iso
10 mg/kg
1 mg/kg
0.1 mg/kg
0.01 mg/kg
hamIgG iso
CTLA4
TPP15285

图48

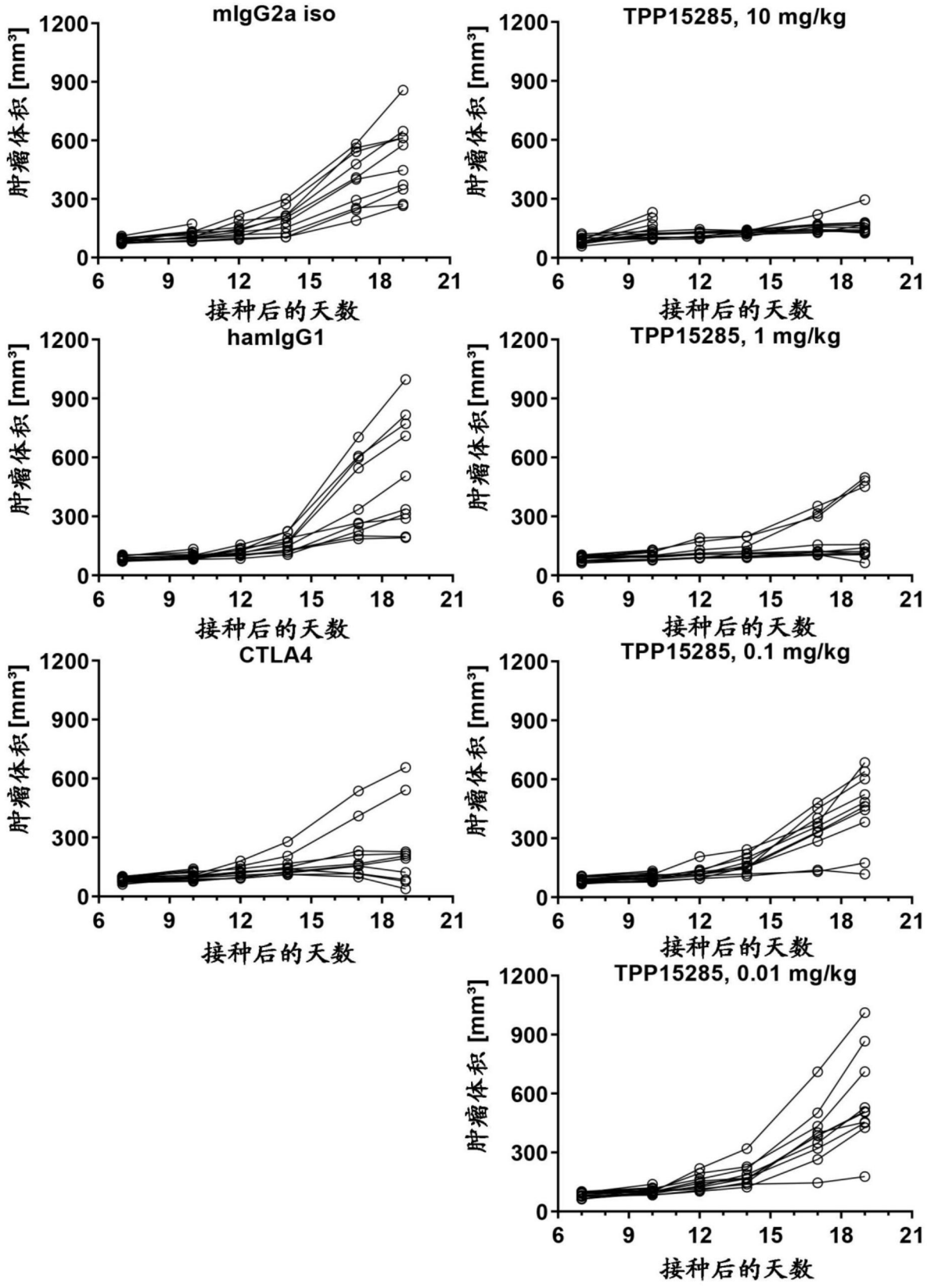

mIgG2a iso
TPP15285, 10 mg/kg
hamIgG1
TPP15285, 1 mg/kg
CTLA4
TPP15285, 0.1 mg/kg
TPP15285, 0.01 mg/kg
肿瘤体积 [mm³]
接种后的天数
0
300
600
900
1200
6
9
12
15
18
21

图49

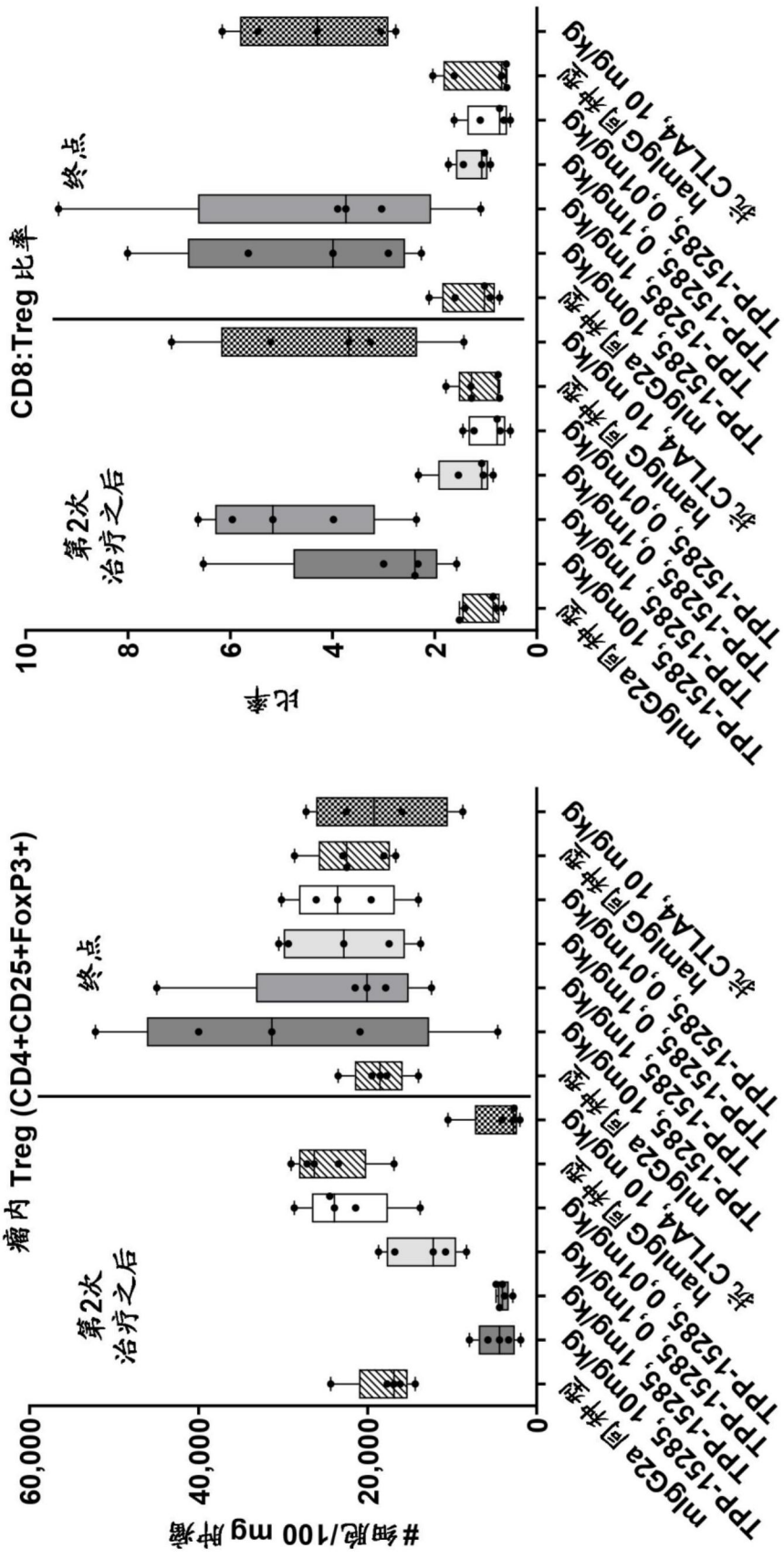

CD8:Treg 比率
终点
第2次治疗之后
比率
10
8
6
4
2
0
TPP-15285 同种型
TPP-15285, 10mg/kg
TPP-15285, 1mg/kg
TPP-15285, 0.1mg/kg
TPP-15285, 0.01mg/kg
抗 CTLA4, 10 mg/kg
hamIgG 同种型
TPP-15285, 0.01mg/kg
TPP-15285, 0.1mg/kg
TPP-15285, 1mg/kg
TPP-15285, 10mg/kg
mIgG2a 同种型
抗 CTLA4, 10 mg/kg
hamIgG 同种型
瘤内 Treg (CD4+CD25+FoxP3+)
终点
第2次治疗之后
#细胞/100 mg 肿瘤
60,000
40,000
20,000
0
TPP-15285 同种型
TPP-15285, 10mg/kg
TPP-15285, 1mg/kg
TPP-15285, 0.1mg/kg
TPP-15285, 0.01mg/kg
抗 CTLA4, 10 mg/kg
hamIgG 同种型
TPP-15285, 0.01mg/kg
TPP-15285, 0.1mg/kg
TPP-15285, 1mg/kg
TPP-15285, 10mg/kg
mIgG2a 同种型
抗 CTLA4, 10 mg/kg
hamIgG 同种型

图50

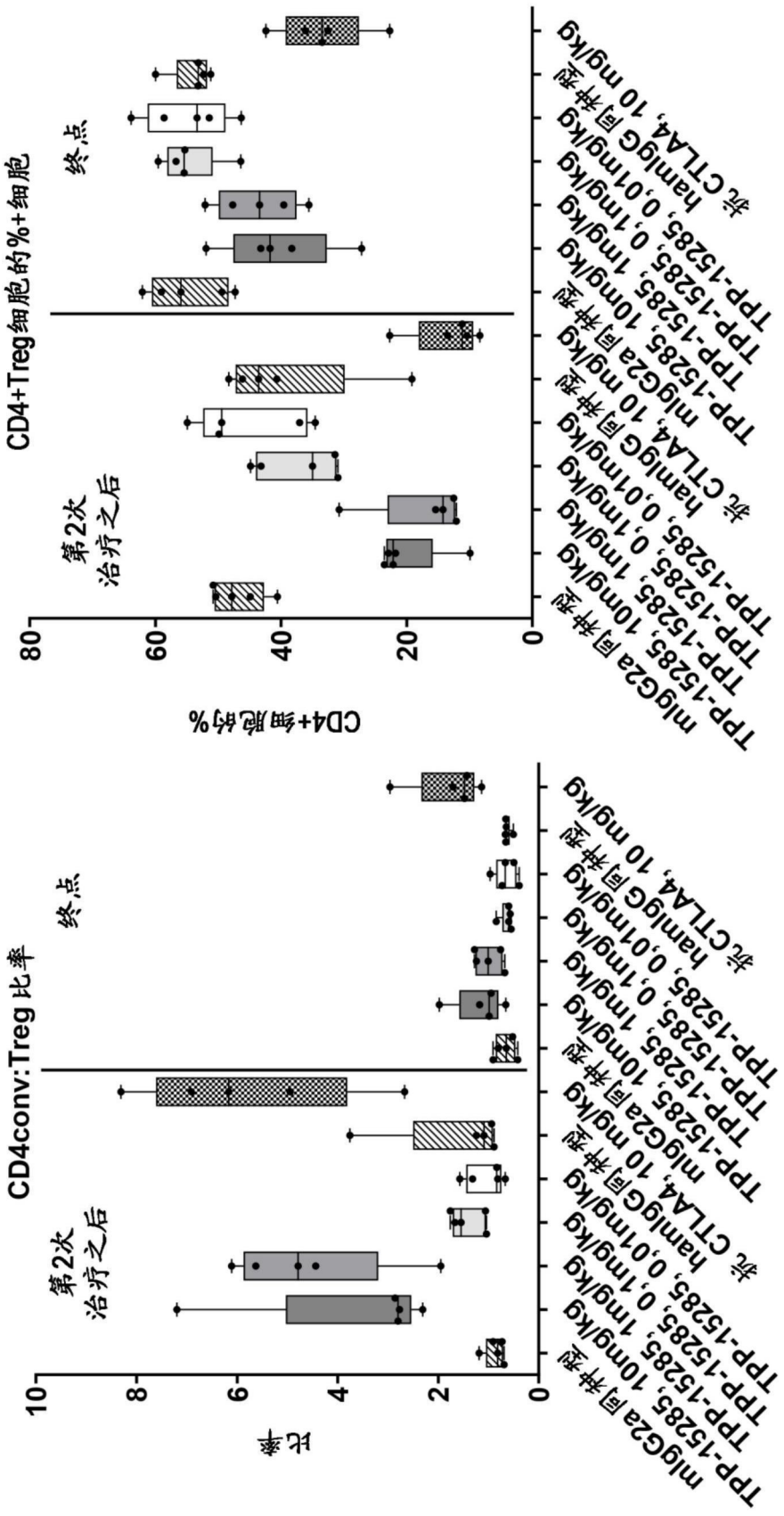

CD4+Treg细胞的%+细胞
第2次治疗之后
终点
CD4+细胞的%
0
20
40
60
80
mIgG2a 同种型
TPP-15285, 10mg/kg
TPP-15285, 1mg/kg
TPP-15285, 0.1mg/kg
抗 CTLA4, 10 mg/kg
hamIgG 同种型
TPP-15285, 0.01mg/kg
CD4conv:Treg 比率
第2次治疗之后
终点
比率
0
2
4
6
8
10

图50(续)

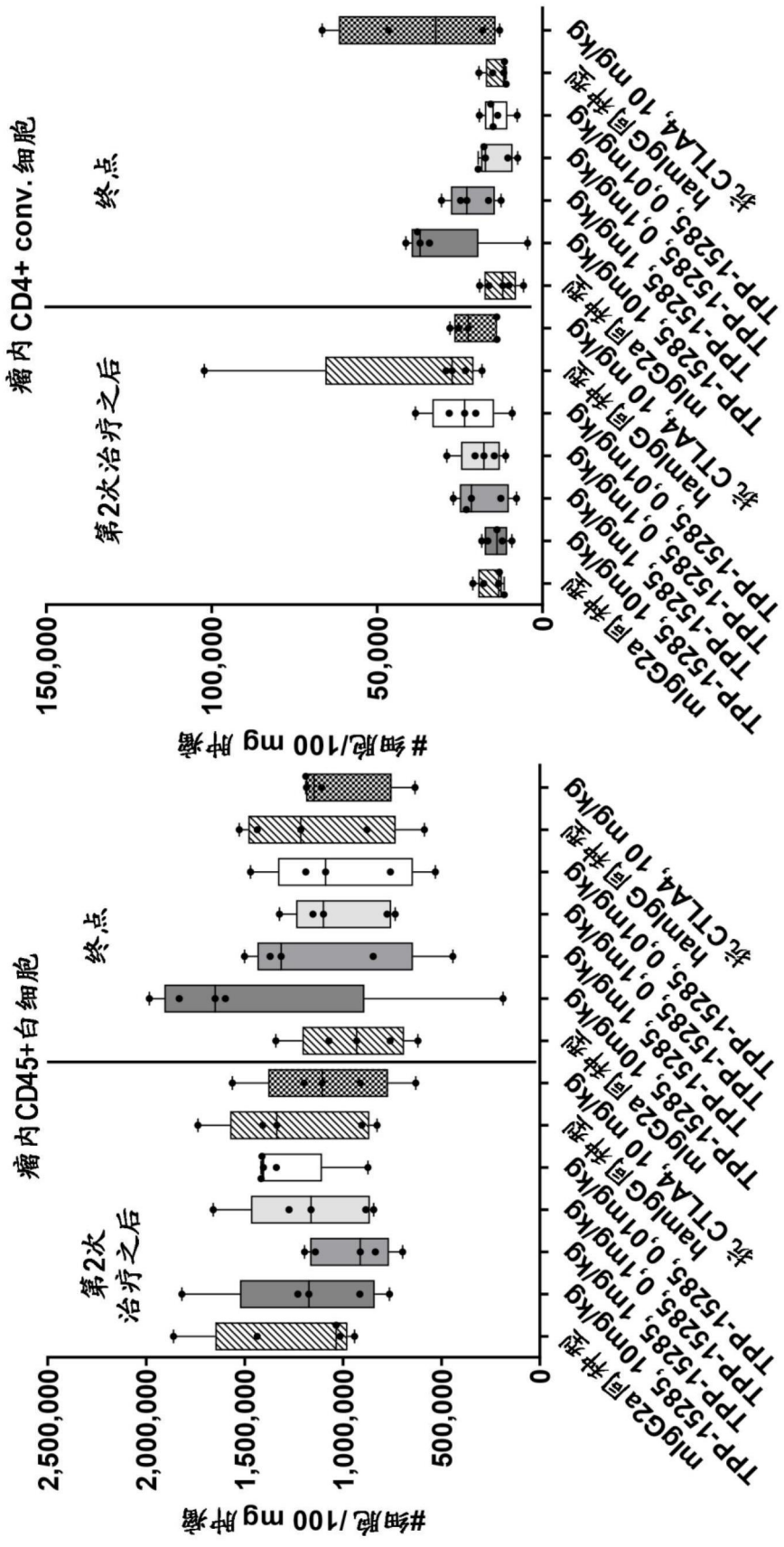

瘤内 CD4+ conv.细胞
终点
第2次治疗之后
#细胞/100 mg 肿瘤
150,000
100,000
50,000
0
mIgG2a 同种型
TPP-15285, 10mg/kg
TPP-15285, 1mg/kg
TPP-15285, 0.1mg/kg
TPP-15285, 0.01mg/kg
抗 CTLA4, 10 mg/kg
hamIgG 同种型
瘤内CD45+白细胞
终点
第2次治疗之后
#细胞/100 mg 肿瘤
2,500,000
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
mIgG2a 同种型
TPP-15285, 10mg/kg
TPP-15285, 1mg/kg
TPP-15285, 0.1mg/kg
TPP-15285, 0.01mg/kg
抗 CTLA4, 10 mg/kg
hamIgG 同种型

图51

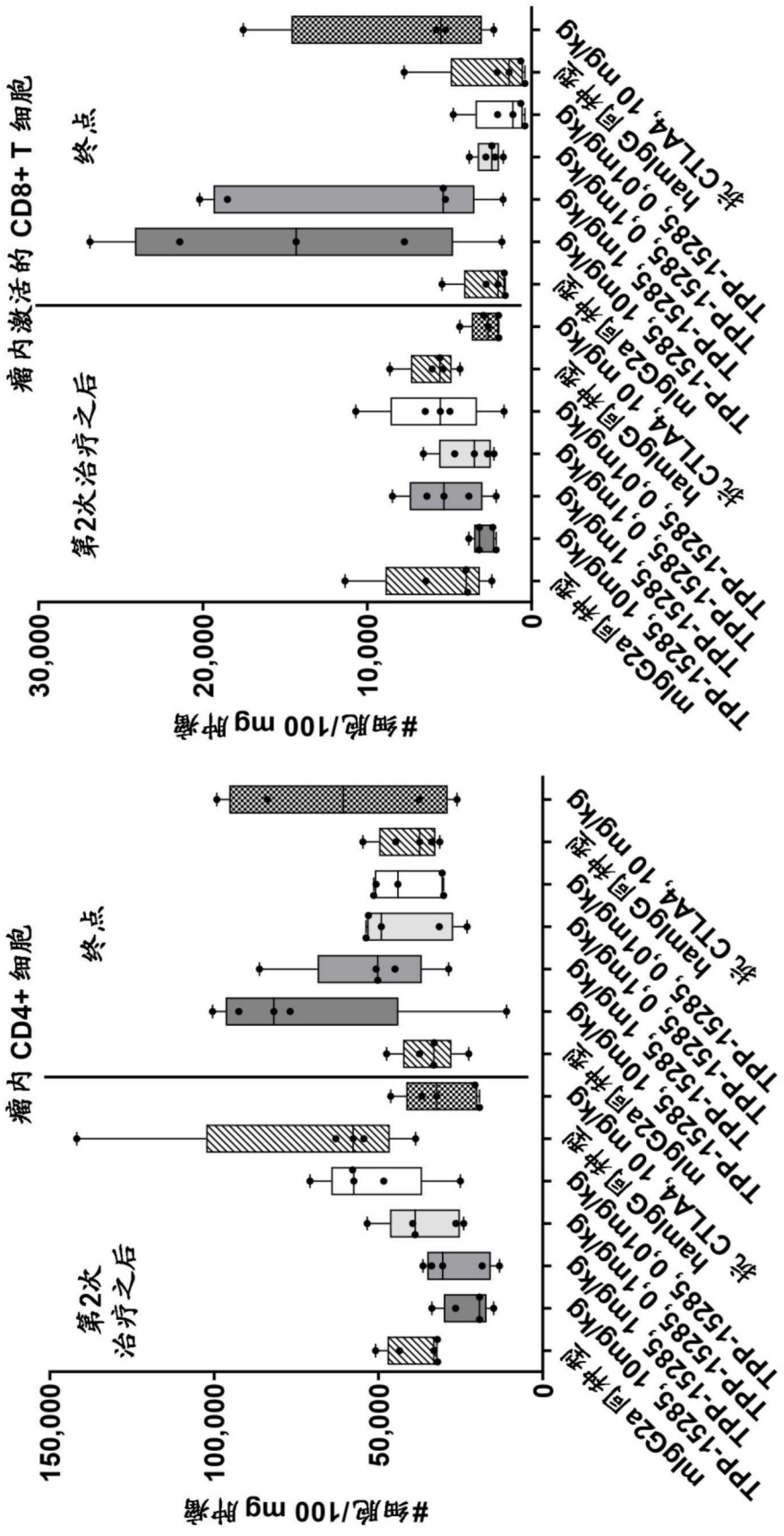

瘤内激活的 CD8+ T 细胞
终点
第2次治疗之后
#细胞/100 mg 肿瘤
30,000
20,000
10,000
0
TPP-15285 同种类
TPP-15285, 10mg/kg
TPP-15285, 1mg/kg
TPP-15285, 0.1mg/kg
TPP-15285, 0.01mg/kg
hamIgG 同种类
抗 CTLA4, 10 mg/kg
mIgG2a 同种类
瘤内 CD4+ 细胞
终点
第2次治疗之后
#细胞/100 mg 肿瘤
150,000
100,000
50,000
0

图51(续)

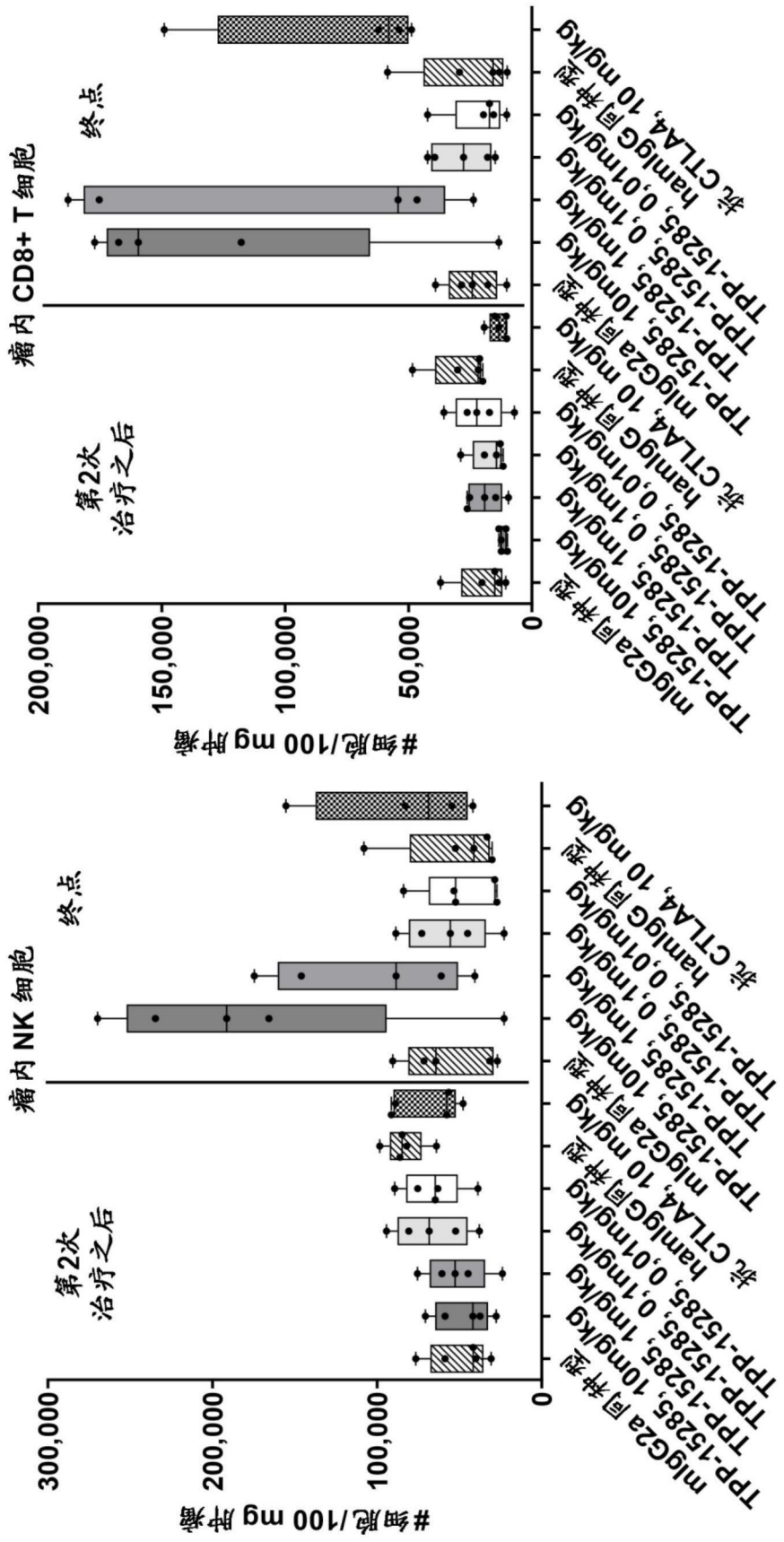

瘤内 CD8+ T细胞
终点
第2次治疗之后
#细胞/100 mg 肿瘤
200,000
150,000
100,000
50,000
0
mIgG2a 同种型
TPP-1528S, 10mg/kg
TPP-1528S, 1mg/kg
TPP-1528S, 0.1mg/kg
TPP-1528S, 0.01mg/kg
hamIgG 同种型
抗 CTLA4, 10 mg/kg
瘤内 NK细胞
终点
第2次治疗之后
#细胞/100 mg 肿瘤
300,000
200,000
100,000
0

图51(续)

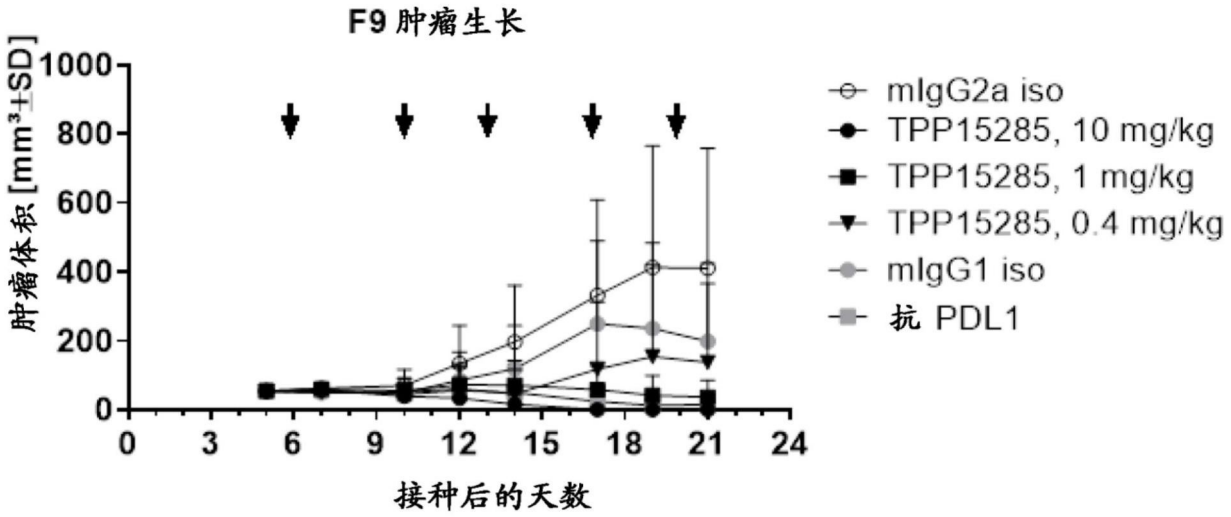

F9 肿瘤生长
肿瘤体积 [mm³±SD]
1000
800
600
400
200
0
0
3
6
9
12
15
18
21
24
接种后的天数
mIgG2a iso
TPP15285, 10 mg/kg
TPP15285, 1 mg/kg
TPP15285, 0.4 mg/kg
mIgG1 iso
抗 PDL1

图52

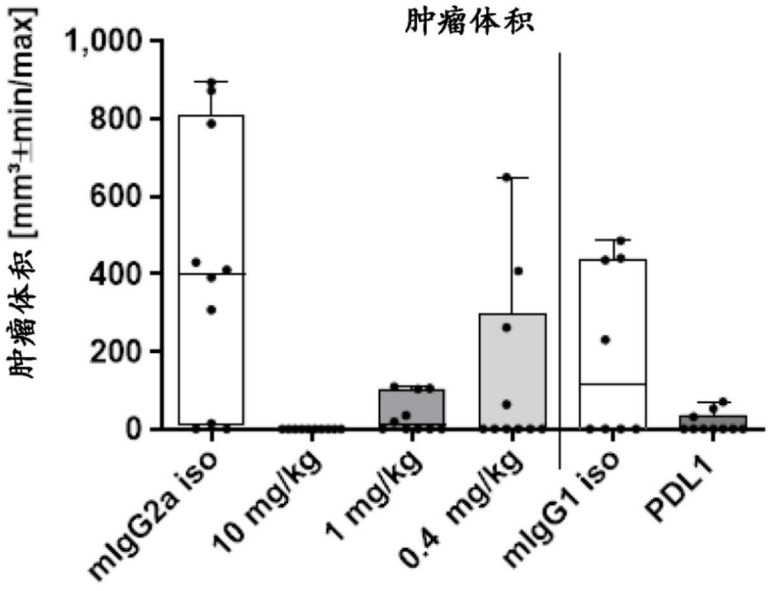

肿瘤体积
肿瘤体积 [mm³±min/max]
1,000
800
600
400
200
0
mIgG2a iso
10 mg/kg
1 mg/kg
0.4 mg/kg
mIgG1 iso
PDL1

图53

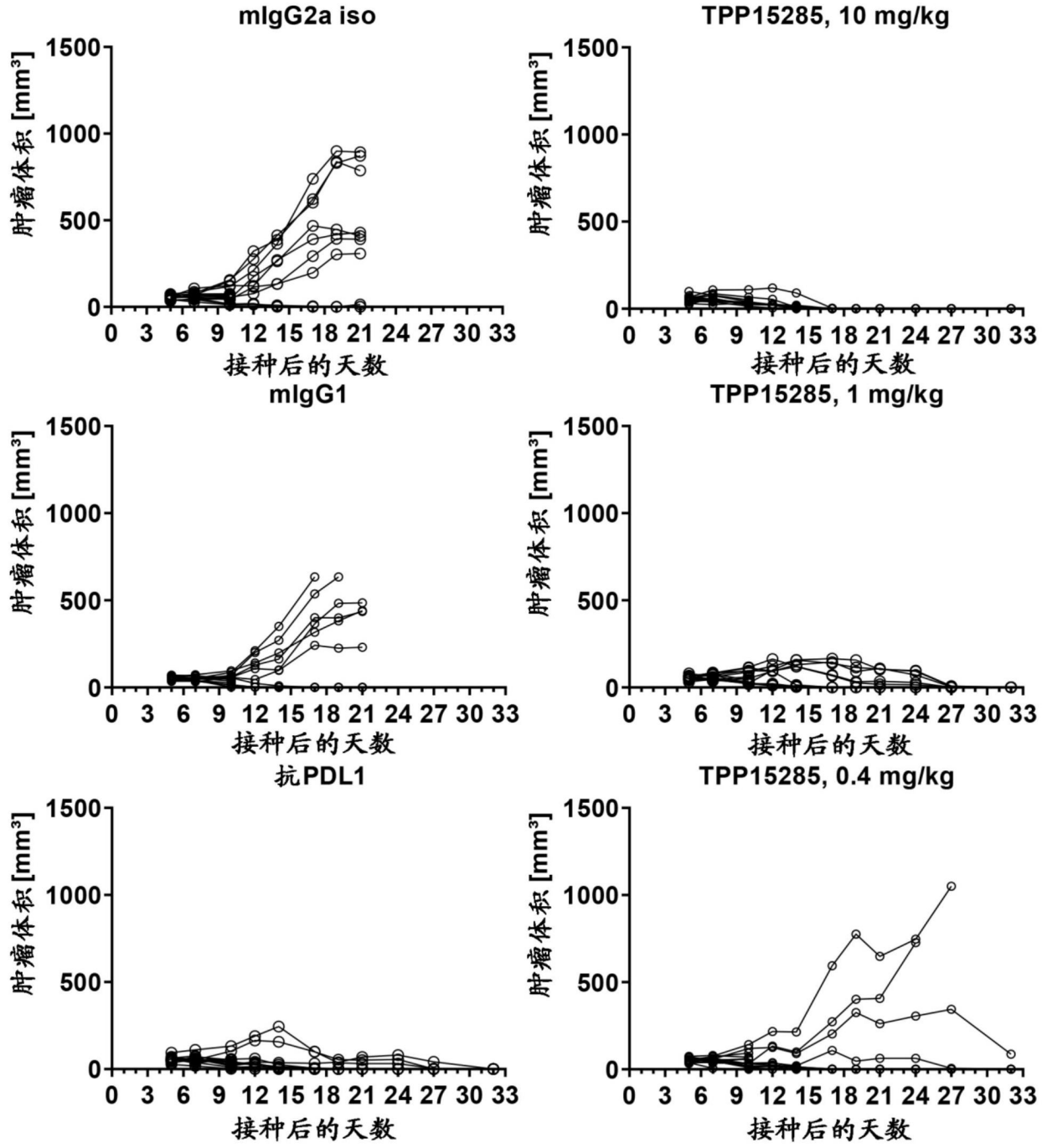

mIgG2a iso
TPP15285, 10 mg/kg
mIgG1
TPP15285, 1 mg/kg
抗PDL1
TPP15285, 0.4 mg/kg
肿瘤体积 [mm³]
1500
1000
500
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33
接种后的天数

图54

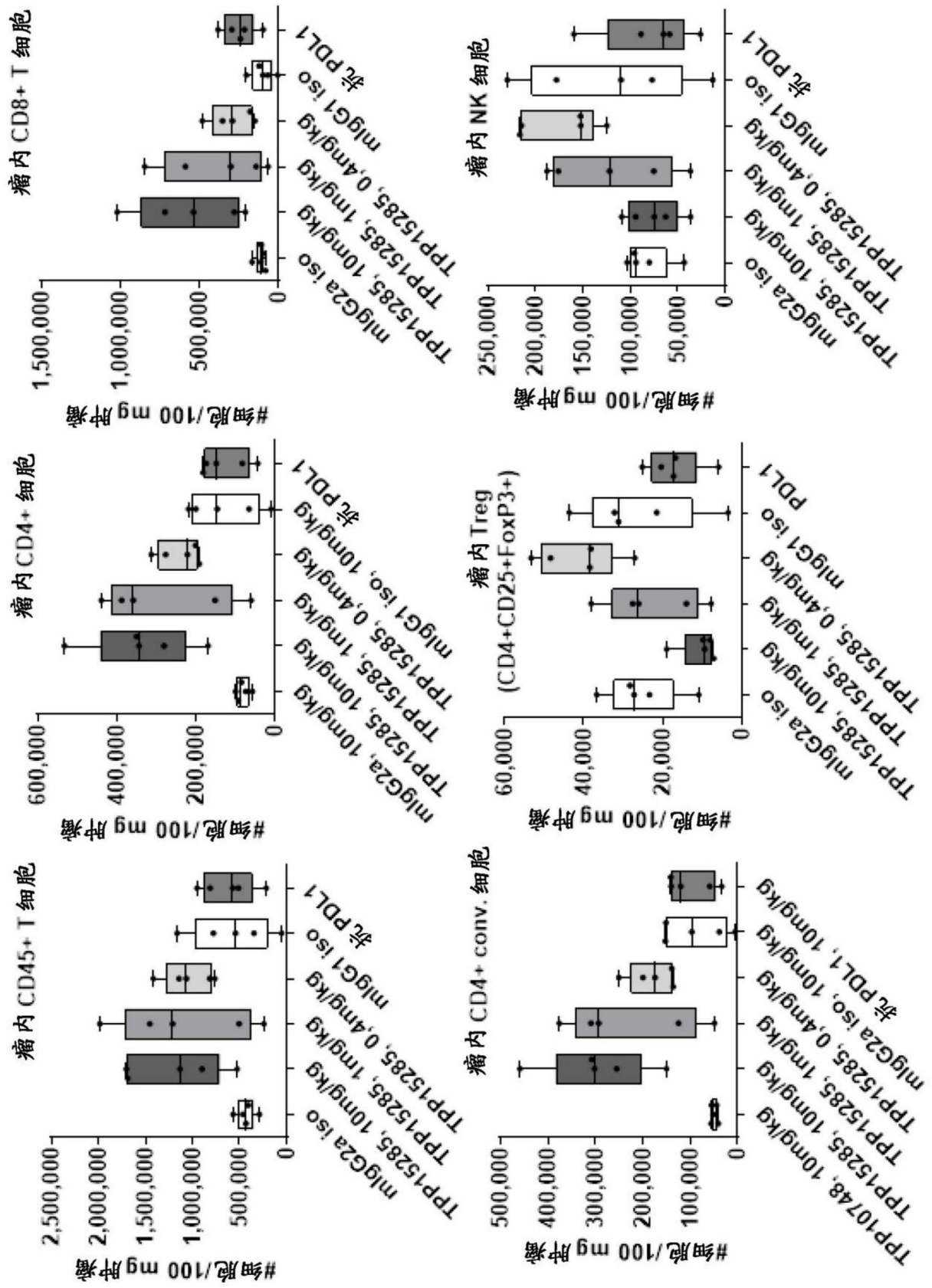

瘤内 CD8+ T 细胞
瘤内 NK 细胞
瘤内 CD4+ 细胞
瘤内 Treg (CD4+CD25+FoxP3+)
瘤内 CD45+ T 细胞
瘤内 CD4+ conv. 细胞
#细胞/100 mg 肿瘤
mIgG2a iso
TPP15285, 10mg/kg
TPP15285, 1mg/kg
TPP15285, 0.4mg/kg
mIgG1 iso
抗 PDL1
PDL1
TPP10748, 10mg/kg

图55

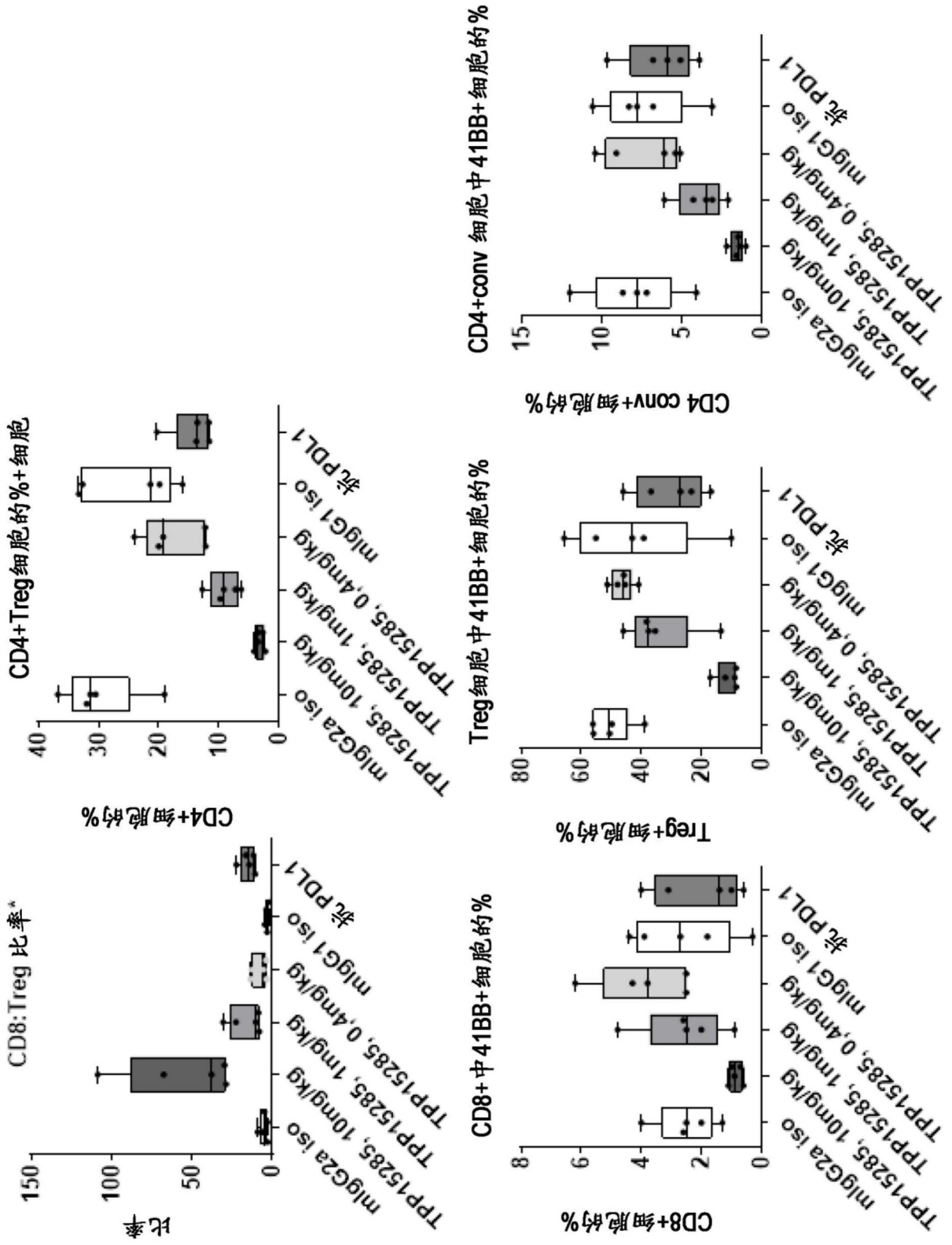

CD8:Treg 比率*
比率
CD4+细胞的%
CD4+Treg细胞的%+细胞
CD8+细胞的%
CD8+中41BB+细胞的%
Treg+细胞的%
Treg细胞中41BB+细胞的%
CD4 conv+细胞的%
CD4+conv 细胞中41BB+细胞的%
mIgG2a iso
TPP15285, 10mg/kg
TPP15285, 1mg/kg
TPP15285, 0.4mg/kg
mIgG1 iso
抗 PDL1

图56

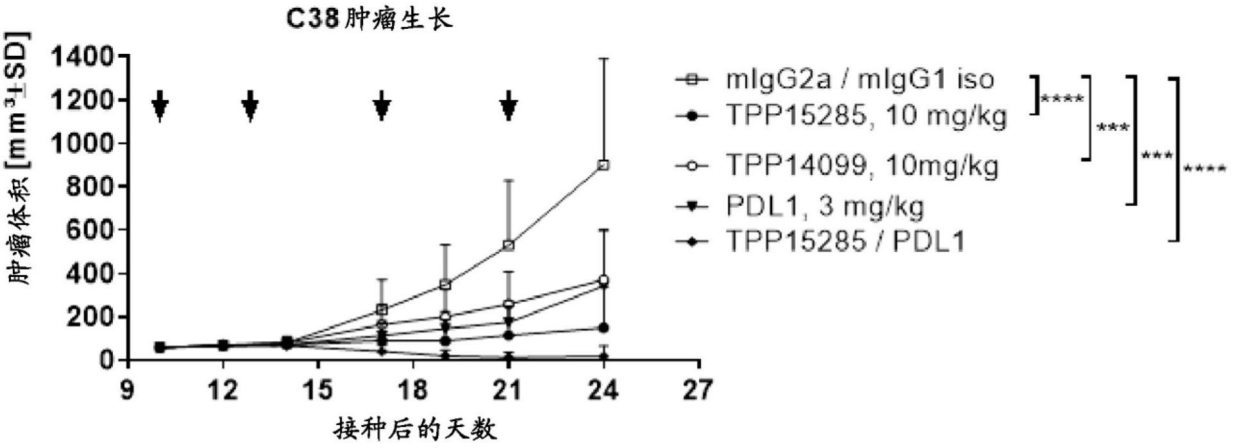

C38肿瘤生长
肿瘤体积 [mm³±SD]
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
9
12
15
18
21
24
27
接种后的天数
mIgG2a / mIgG1 iso
TPP15285, 10 mg/kg
TPP14099, 10mg/kg
PDL1, 3 mg/kg
TPP15285 / PDL1
****
***
***
****

图57a

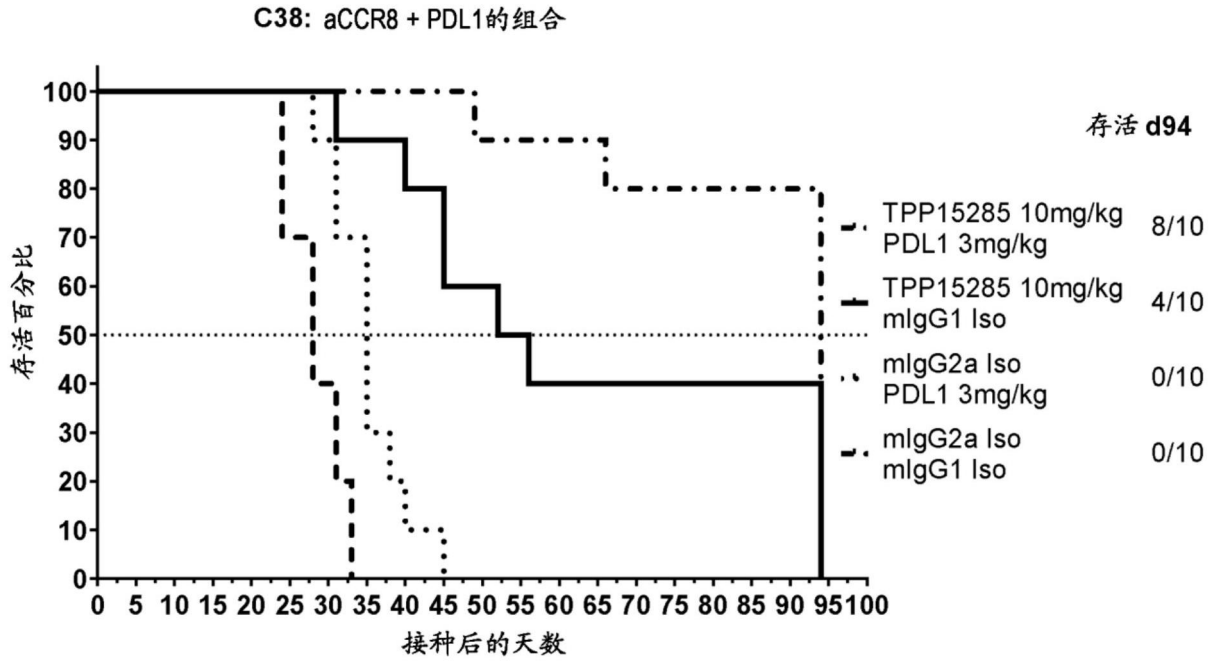

C38: aCCR8 + PDL1的组合
存活百分比
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95100
接种后的天数
存活 d94
TPP15285 10mg/kg
PDL1 3mg/kg
8/10
TPP15285 10mg/kg
mIgG1 Iso
4/10
mIgG2a Iso
PDL1 3mg/kg
0/10
mIgG2a Iso
mIgG1 Iso
0/10

图57b

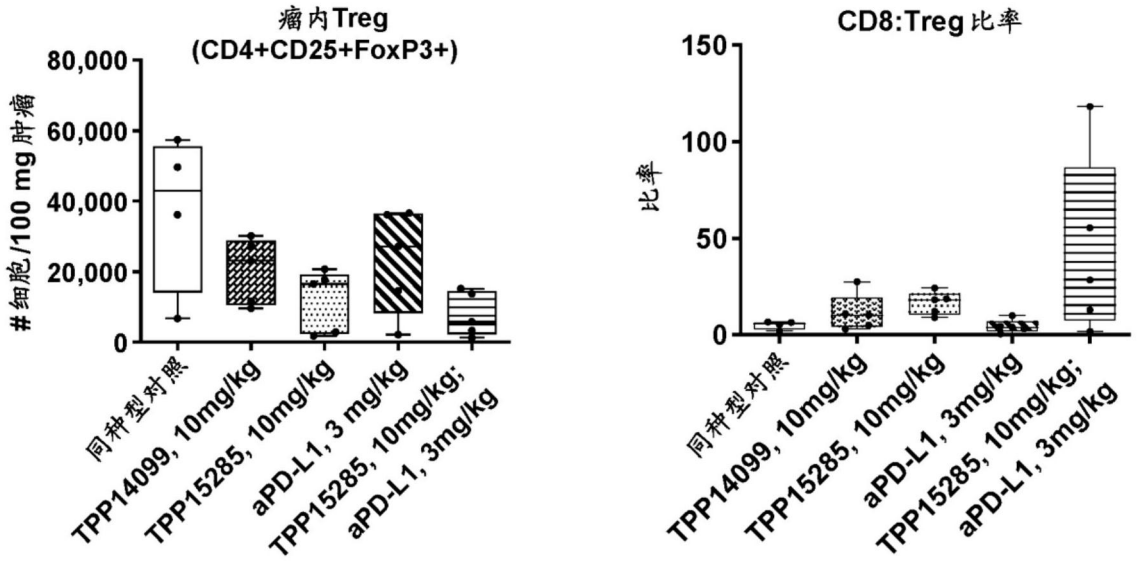

瘤内Treg
(CD4+CD25+FoxP3+)
细胞/100 mg 肿瘤
80,000
60,000
40,000
20,000
0
同种型对照
TPP14099, 10mg/kg
TPP15285, 10mg/kg
aPD-L1, 3 mg/kg
TPP15285, 10mg/kg;
aPD-L1, 3mg/kg
CD8:Treg比率
比率
150
100
50
0
同种型对照
TPP14099, 10mg/kg
TPP15285, 10mg/kg
aPD-L1, 3mg/kg
TPP15285, 10mg/kg;
aPD-L1, 3mg/kg

图58

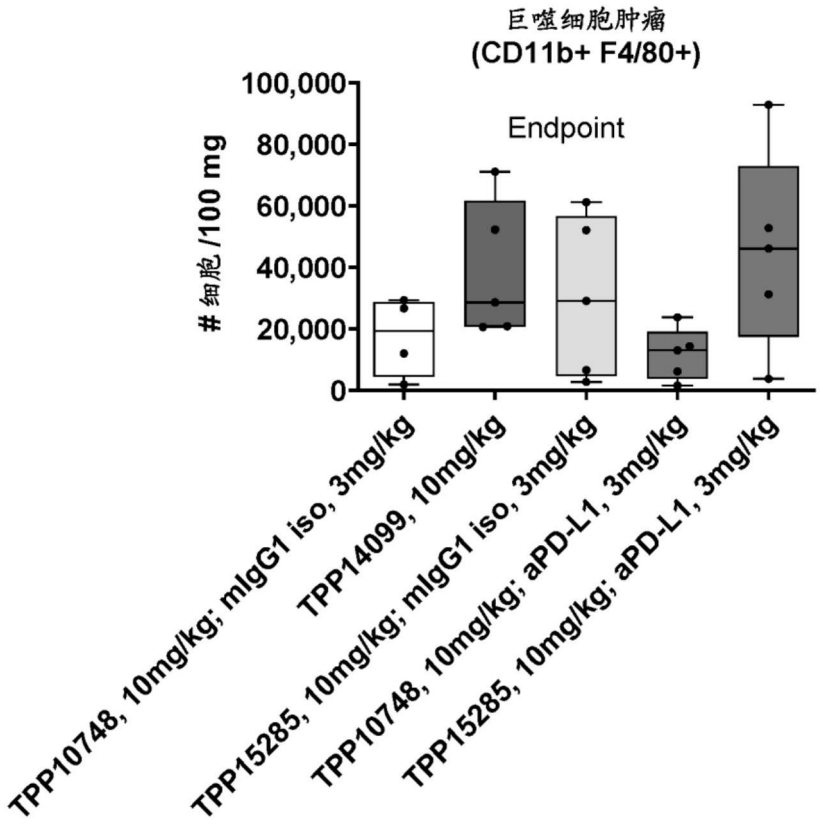

巨噬细胞肿瘤
(CD11b+ F4/80+)
Endpoint
细胞/100 mg
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
TPP10748, 10mg/kg; mIgG1 iso, 3mg/kg
TPP14099, 10mg/kg
TPP15285, 10mg/kg; mIgG1 iso, 3mg/kg
TPP10748, 10mg/kg; aPD-L1, 3mg/kg
TPP15285, 10mg/kg; aPD-L1, 3mg/kg

图59

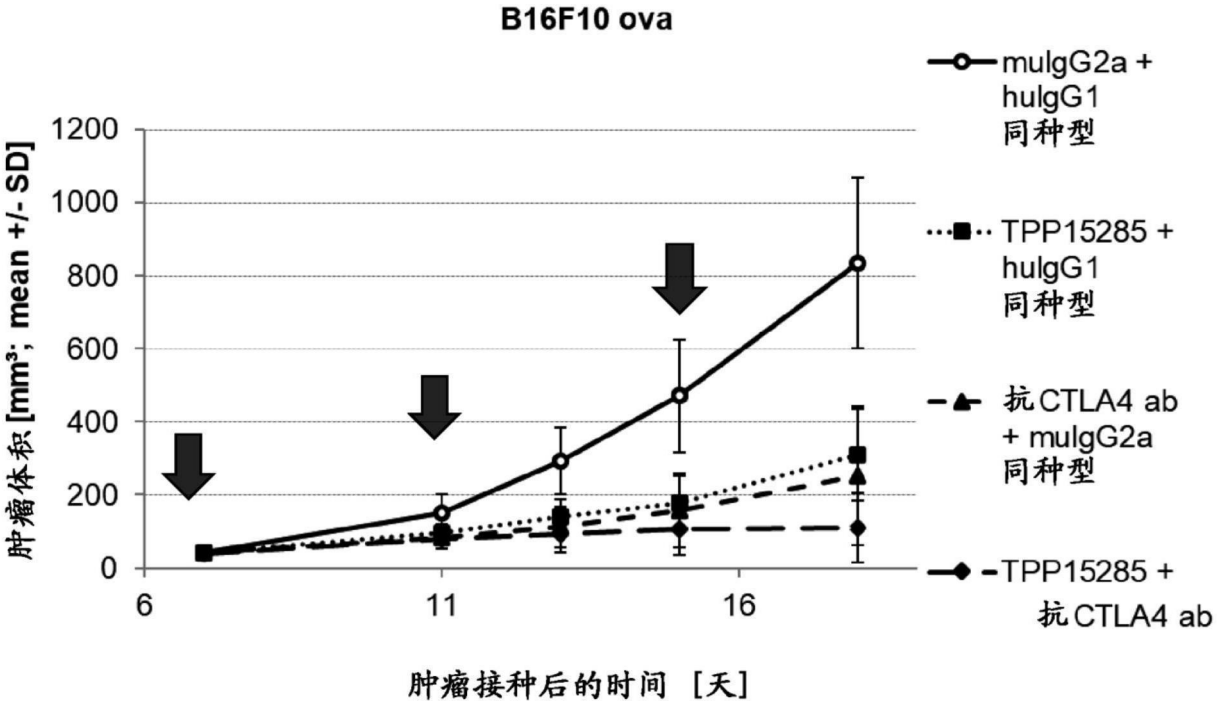

B16F10 ova
肿瘤体积 [mm³; mean +/- SD]
1200
1000
800
600
400
200
0
6
11
16
肿瘤接种后的时间 [天]
mulgG2a + hulgG1 同种型
TPP15285 + hulgG1 同种型
抗CTLA4 ab + mulgG2a 同种型
TPP15285 + 抗CTLA4 ab

图60

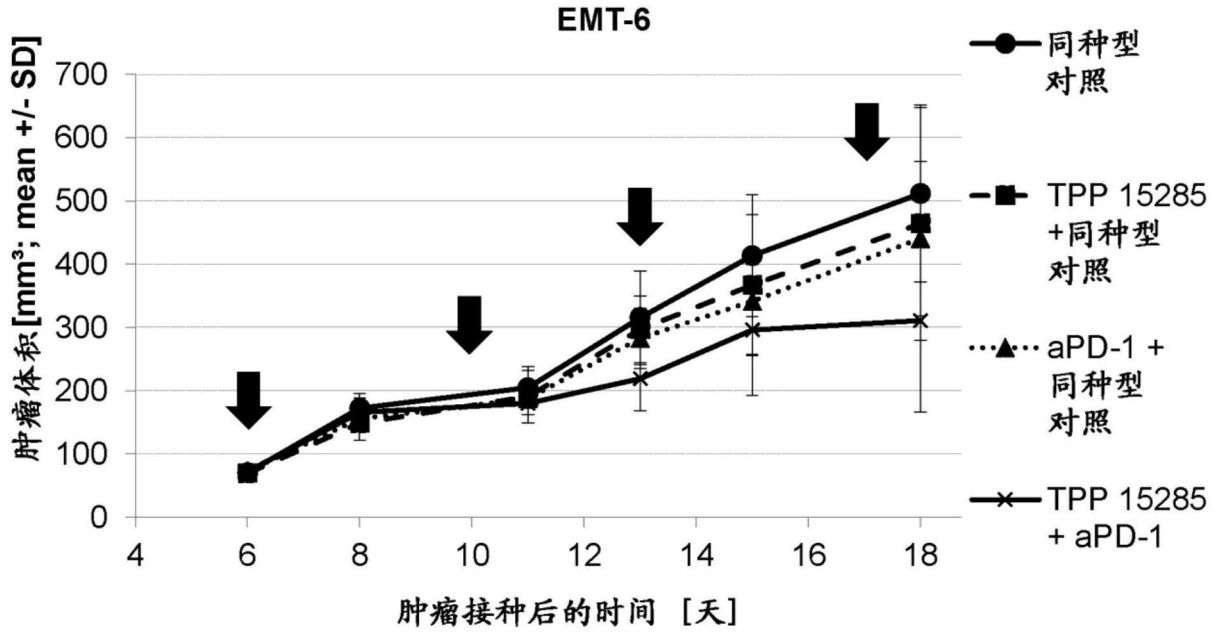

EMT-6
肿瘤体积 [mm³; mean +/- SD]
700
600
500
400
300
200
100
0
4
6
8
10
12
14
16
18
肿瘤接种后的时间 [天]
同种型对照
TPP 15285 +同种型对照
aPD-1 + 同种型对照
TPP 15285 + aPD-1

图61

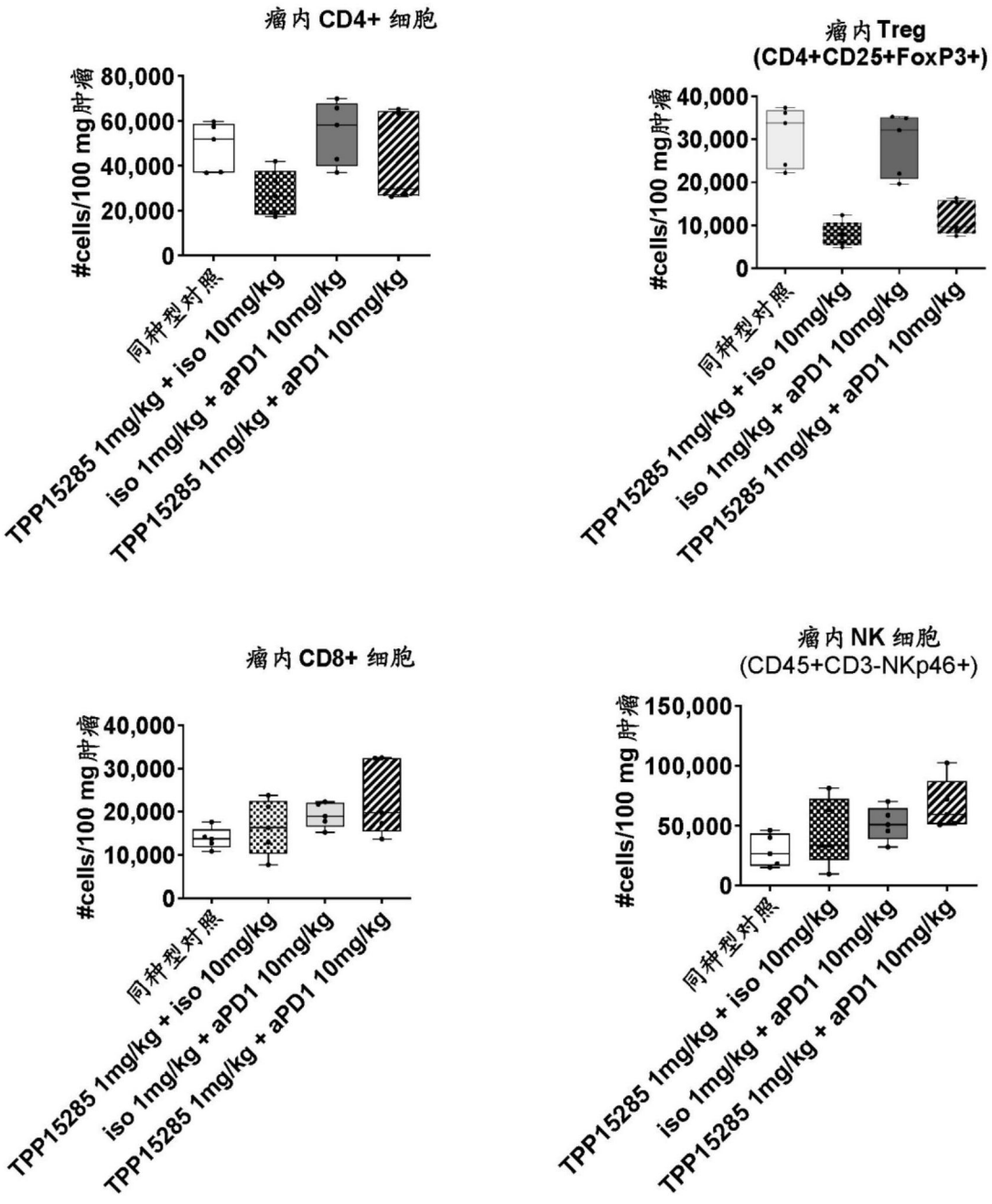

瘤内 CD4+ 细胞
#cells/100 mg 肿瘤
80,000
60,000
40,000
20,000
0
同种型对照
TPP15285 1mg/kg + iso 10mg/kg
iso 1mg/kg + aPD1 10mg/kg
TPP15285 1mg/kg + aPD1 10mg/kg
瘤内 Treg
(CD4+CD25+FoxP3+)
#cells/100 mg 肿瘤
40,000
30,000
20,000
10,000
0
同种型对照
TPP15285 1mg/kg + iso 10mg/kg
iso 1mg/kg + aPD1 10mg/kg
TPP15285 1mg/kg + aPD1 10mg/kg
瘤内 CD8+ 细胞
#cells/100 mg 肿瘤
40,000
30,000
20,000
10,000
0
同种型对照
TPP15285 1mg/kg + iso 10mg/kg
iso 1mg/kg + aPD1 10mg/kg
TPP15285 1mg/kg + aPD1 10mg/kg
瘤内 NK 细胞
(CD45+CD3-NKp46+)
#cells/100 mg 肿瘤
150,000
100,000
50,000
0
同种型对照
TPP15285 1mg/kg + iso 10mg/kg
iso 1mg/kg + aPD1 10mg/kg
TPP15285 1mg/kg + aPD1 10mg/kg

图62

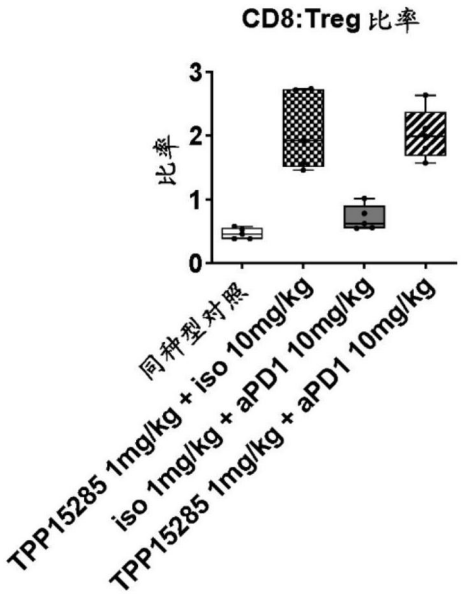

CD8:Treg 比率
比率
3
2
1
0
同种型对照
TPP15285 1mg/kg + iso 10mg/kg
iso 1mg/kg + aPD1 10mg/kg
TPP15285 1mg/kg + aPD1 10mg/kg

图62(续)

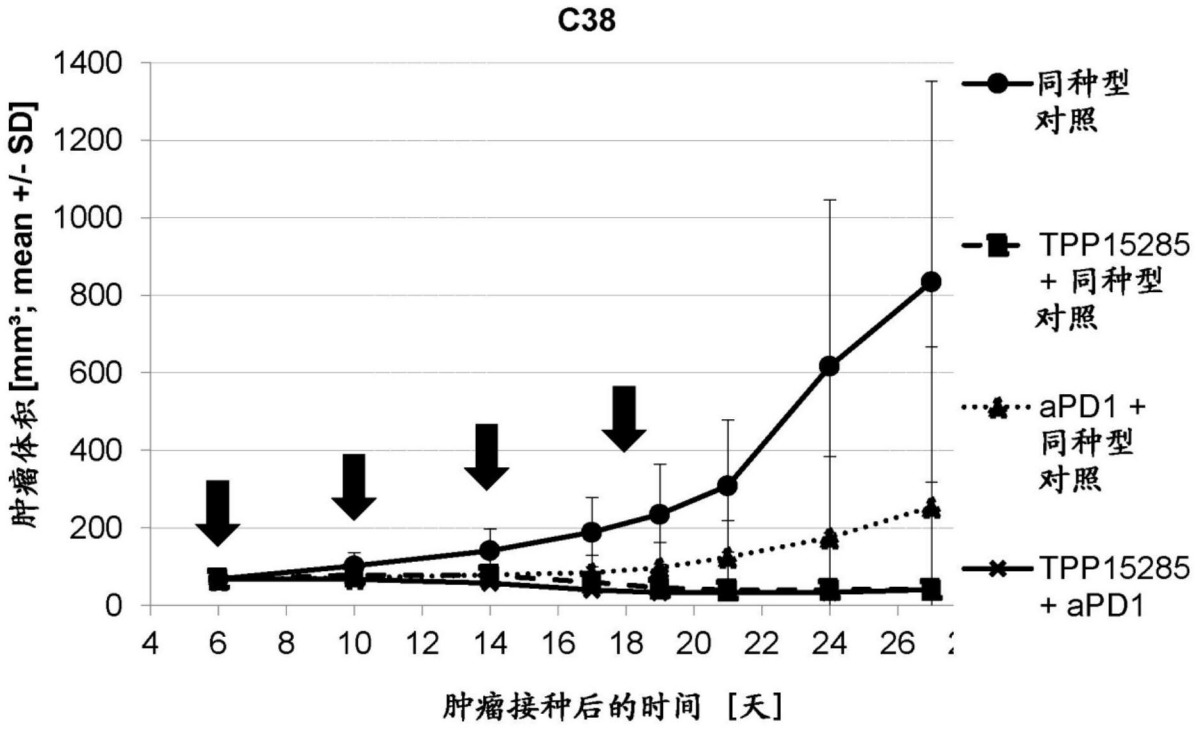

C38
肿瘤体积 [mm³; mean +/- SD]
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
肿瘤接种后的时间 [天]
同种型对照
TPP15285 + 同种型对照
aPD1 + 同种型对照
TPP15285 + aPD1

图63a

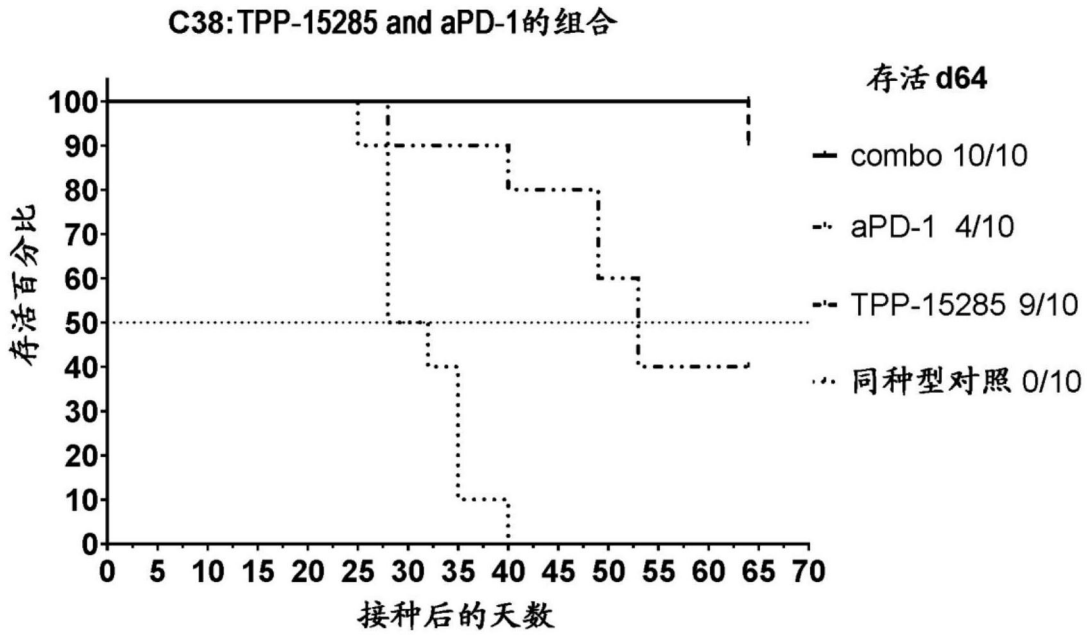

C38:TPP-15285 and aPD-1的组合
存活 d64
combo 10/10
aPD-1 4/10
TPP-15285 9/10
同种型对照 0/10
存活百分比
接种后的天数
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70

图63b

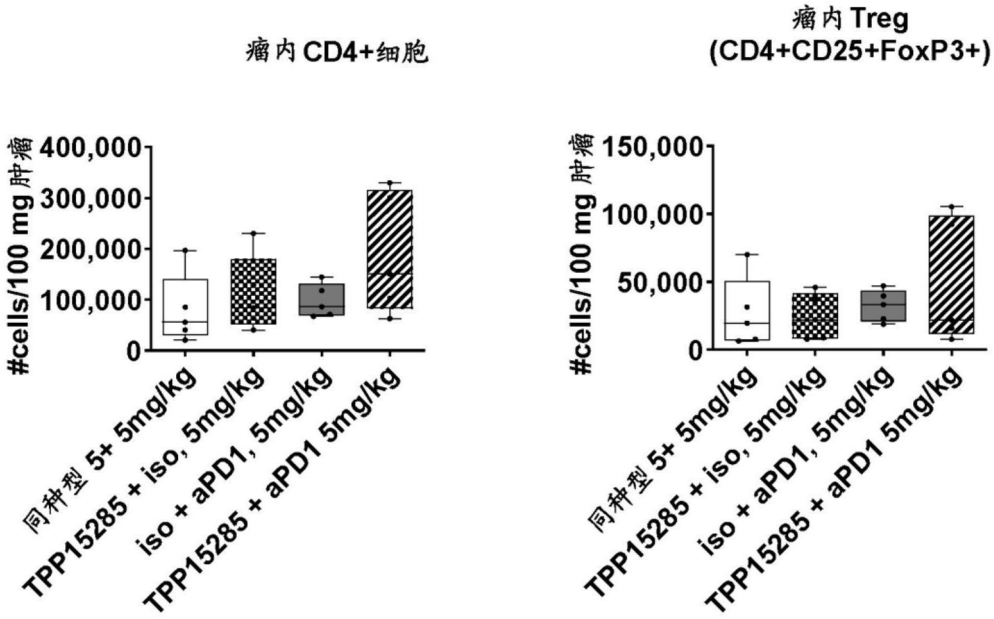

瘤内 CD4+细胞
瘤内 Treg
(CD4+CD25+FoxP3+)
#cells/100 mg 肿瘤
400,000
300,000
200,000
100,000
0
150,000
100,000
50,000
同种型 5+ 5mg/kg
TPP15285 + iso, 5mg/kg
iso + aPD1, 5mg/kg
TPP15285 + aPD1 5mg/kg

图64

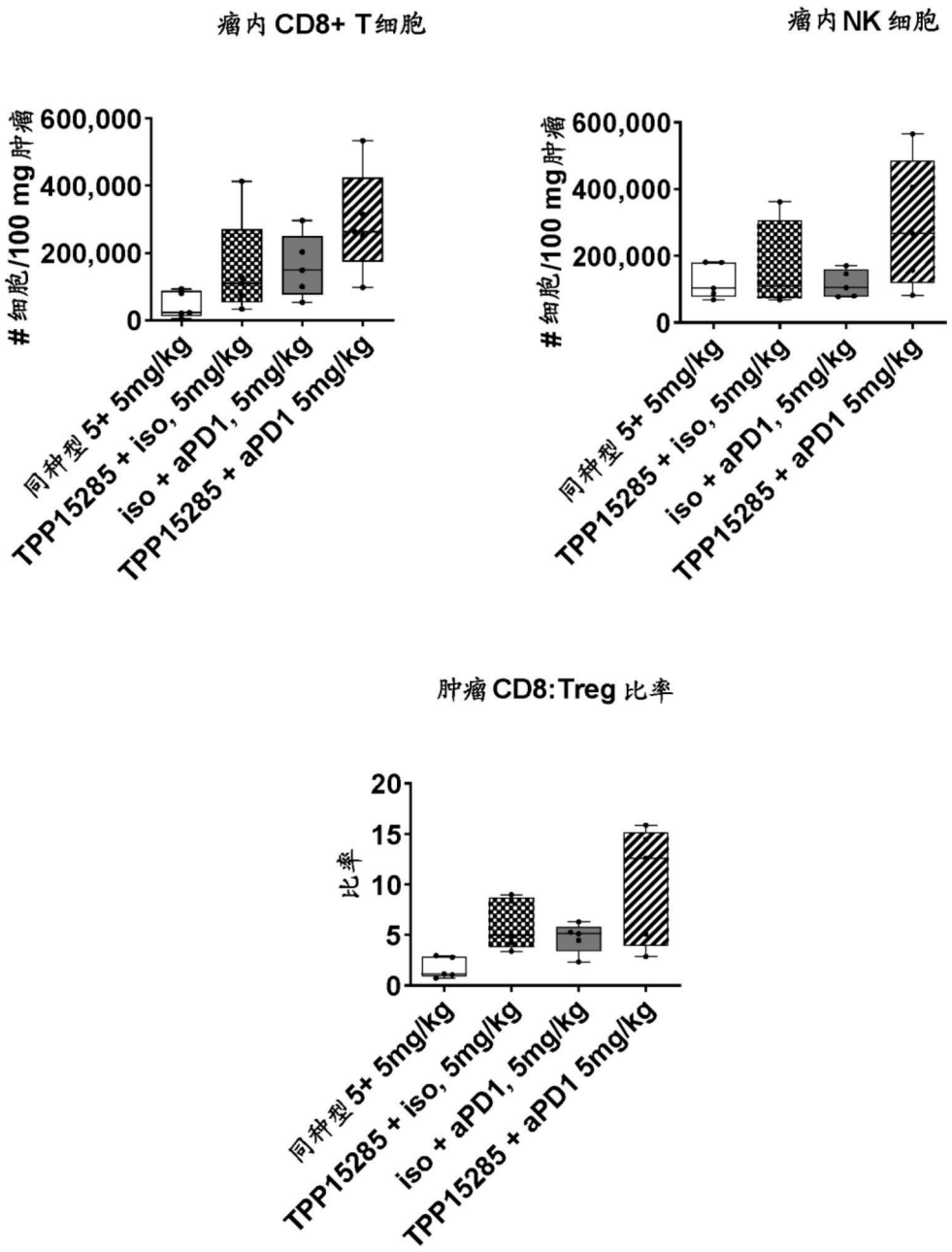

瘤内 CD8+ T细胞
细胞/100 mg 肿瘤
600,000
400,000
200,000
0
同种型 5+ 5mg/kg
TPP15285 + iso, 5mg/kg
iso + aPD1, 5mg/kg
TPP15285 + aPD1 5mg/kg
瘤内 NK 细胞
细胞/100 mg 肿瘤
600,000
400,000
200,000
0
同种型 5+ 5mg/kg
TPP15285 + iso, 5mg/kg
iso + aPD1, 5mg/kg
TPP15285 + aPD1 5mg/kg
肿瘤 CD8:Treg 比率
比率
20
15
10
5
0
同种型 5+ 5mg/kg
TPP15285 + iso, 5mg/kg
iso + aPD1, 5mg/kg
TPP15285 + aPD1 5mg/kg

图64(续)

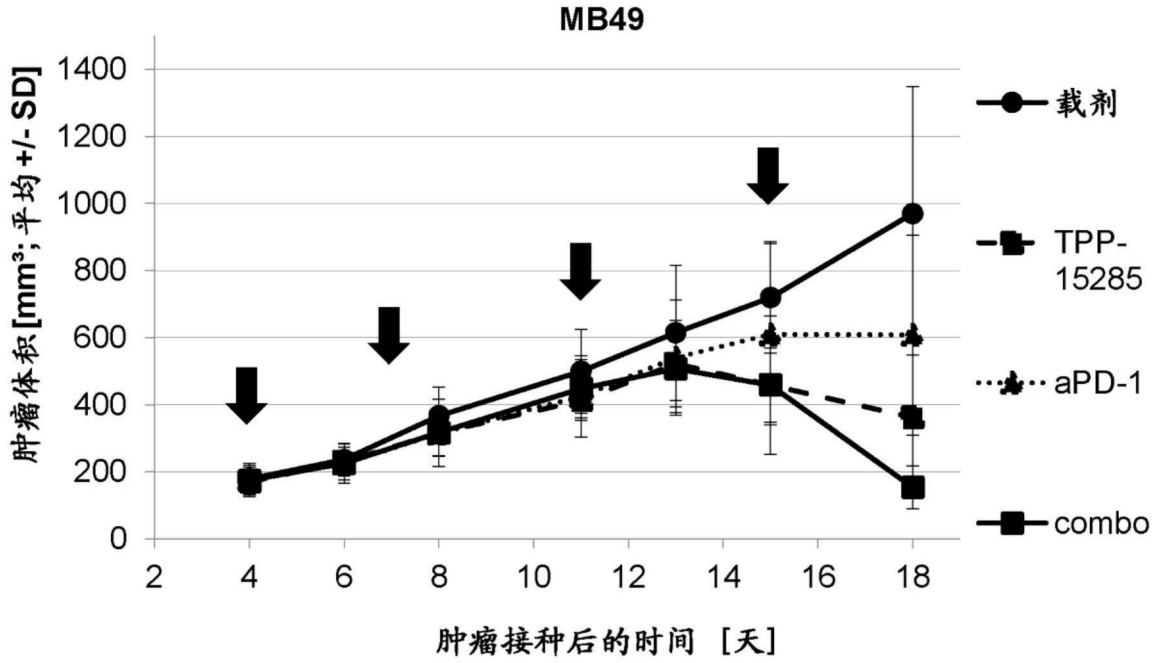

MB49
肿瘤体积[mm³; 平均+/- SD]
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
肿瘤接种后的时间 [天]
载剂
TPP-15285
aPD-1
combo

图65

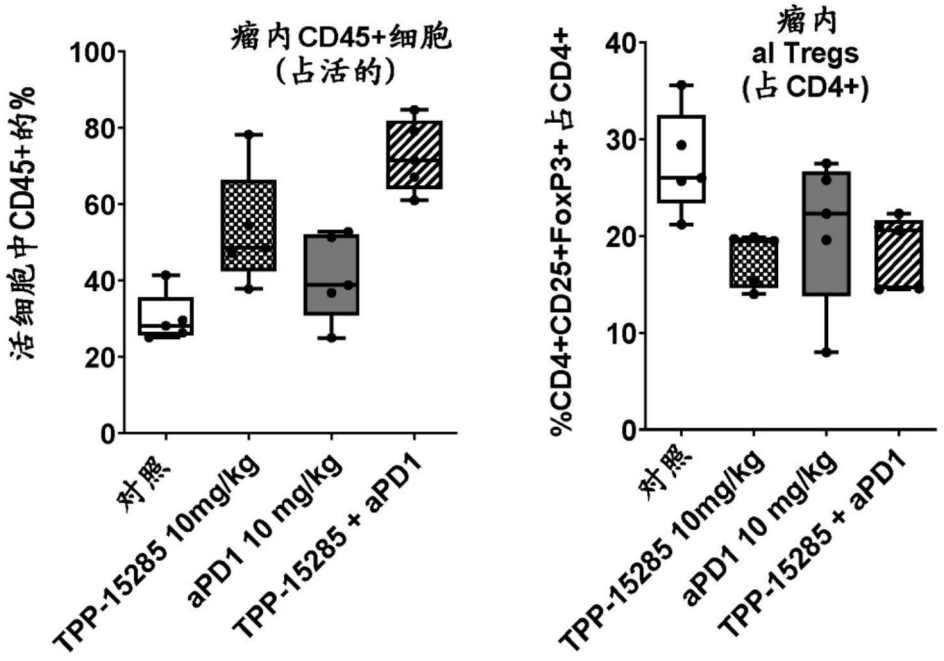

瘤内 CD45+细胞
(占活的)
活细胞中CD45+的%
100
80
60
40
20
0
对照
TPP-15285 10mg/kg
aPD1 10 mg/kg
TPP-15285 + aPD1
瘤内
al Tregs
(占 CD4+)
%CD4+CD25+FoxP3+ 占CD4+
40
30
20
10
0
对照
TPP-15285 10mg/kg
aPD1 10 mg/kg
TPP-15285 + aPD1

图66

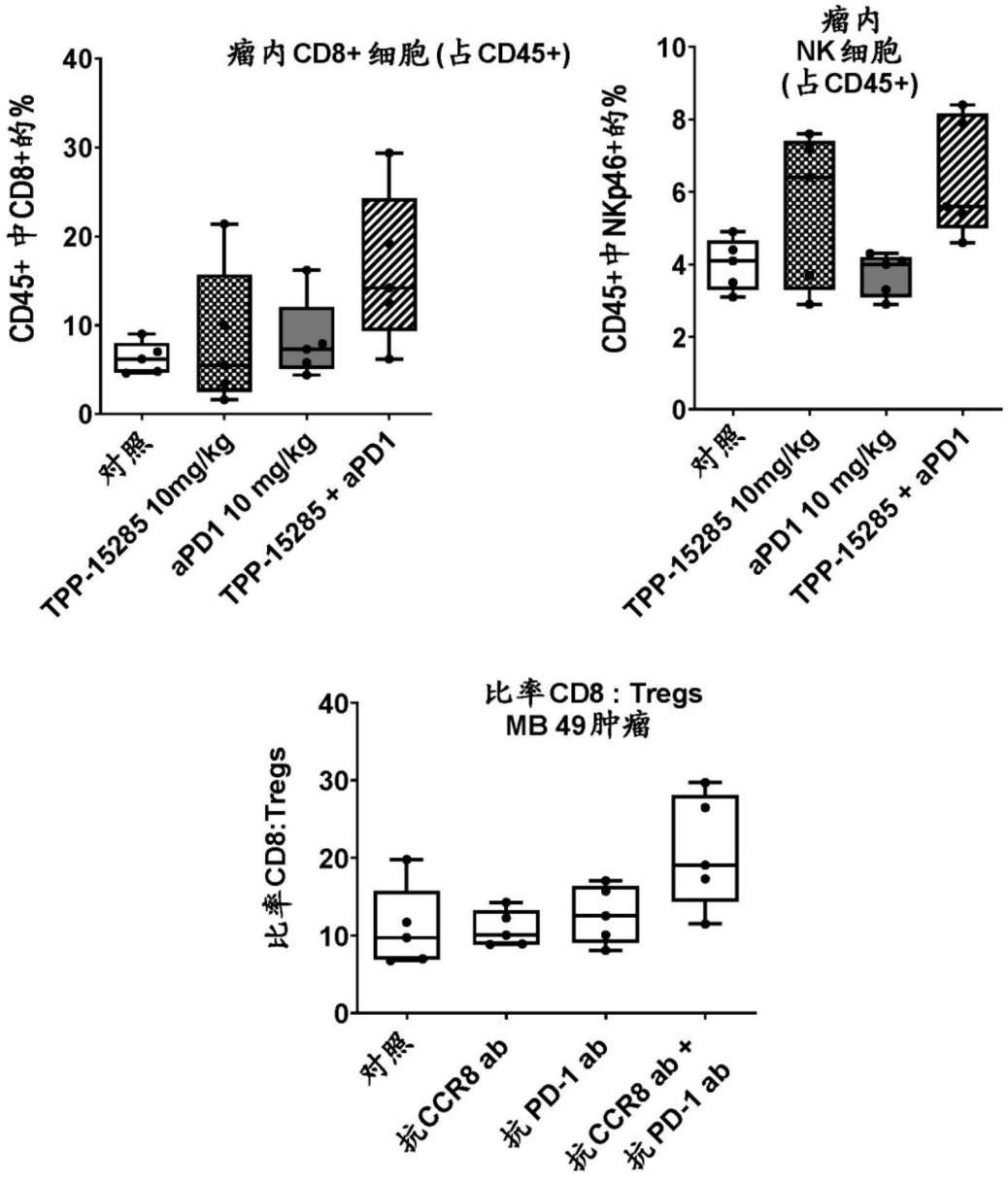

瘤内 CD8+ 细胞 (占 CD45+)
CD45+ 中 CD8+的%
40
30
20
10
0
对照
TPP-15285 10mg/kg
aPD1 10 mg/kg
TPP-15285 + aPD1
瘤内
NK细胞
(占CD45+)
CD45+中NKp46+的%
10
8
6
4
2
0
对照
TPP-15285 10mg/kg
aPD1 10 mg/kg
TPP-15285 + aPD1
比率CD8 : Tregs
MB 49肿瘤
比率CD8:Tregs
40
30
20
10
0
对照
抗CCR8 ab
抗 PD-1 ab
抗CCR8 ab +
抗 PD-1 ab

图66(续)

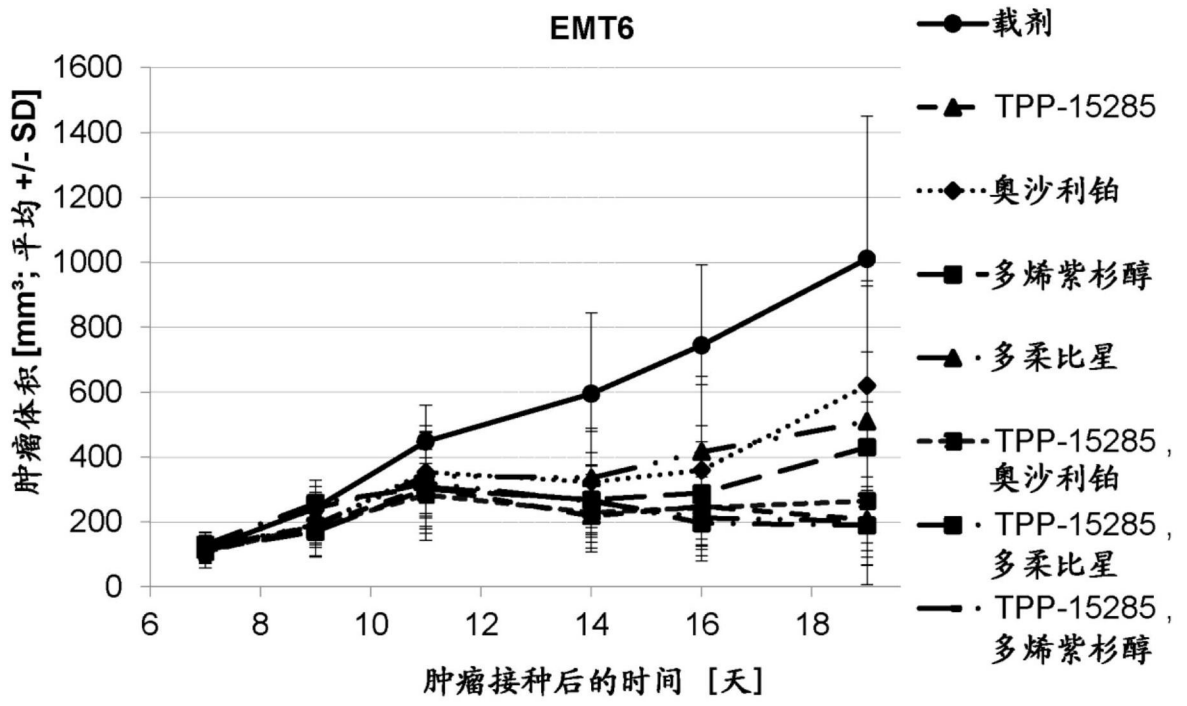

EMT6
肿瘤体积 [mm³; 平均 +/- SD]
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
6
8
10
12
14
16
18
肿瘤接种后的时间 [天]
载剂
TPP-15285
奥沙利铂
多烯紫杉醇
多柔比星
TPP-15285，奥沙利铂
TPP-15285，多柔比星
TPP-15285，多烯紫杉醇

图67

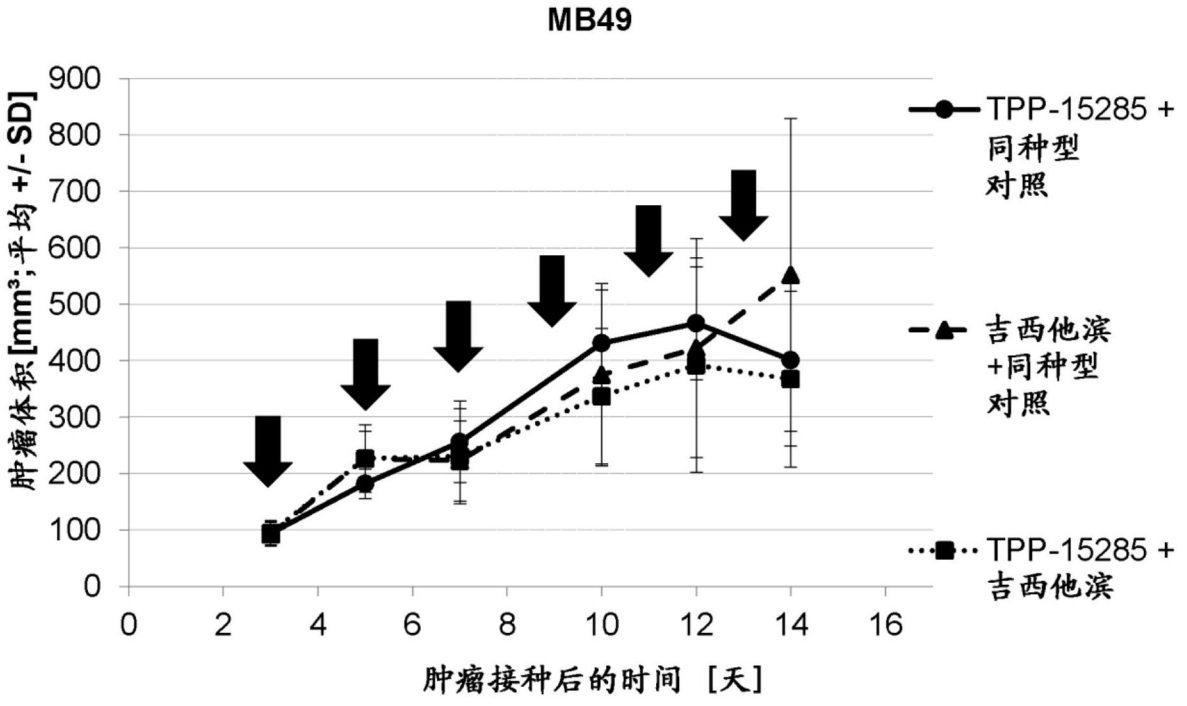

MB49
肿瘤体积 [mm³; 平均 +/- SD]
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
肿瘤接种后的时间 [天]
TPP-15285 + 同种型对照
吉西他滨 +同种型对照
TPP-15285 + 吉西他滨

图68

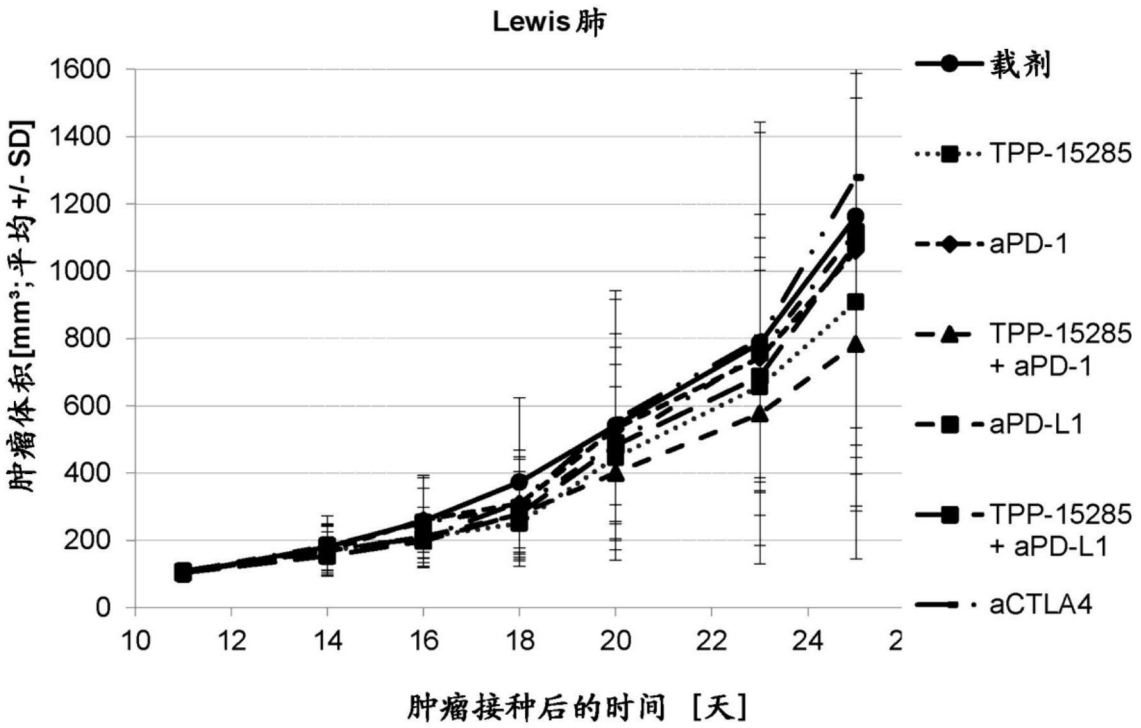

Lewis肺
肿瘤体积[mm³;平均+/- SD]
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
12
14
16
18
20
22
24
2
肿瘤接种后的时间 [天]
载剂
TPP-15285
aPD-1
TPP-15285 + aPD-1
aPD-L1
TPP-15285 + aPD-L1
aCTLA4

图69

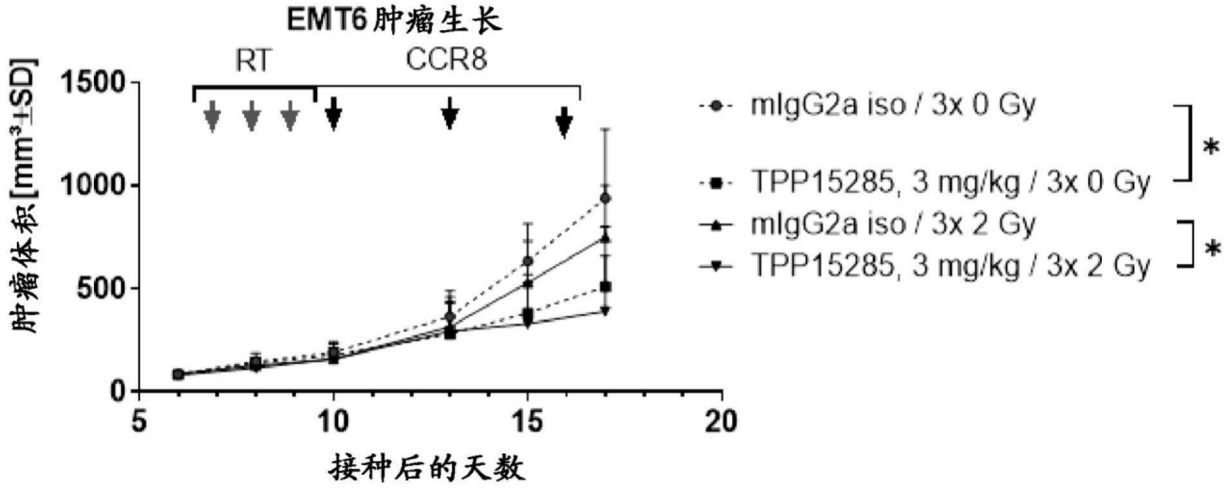

EMT6肿瘤生长
RT
CCR8
肿瘤体积[mm³±SD]
1500
1000
500
0
5
10
15
20
接种后的天数
mIgG2a iso / 3x 0 Gy
TPP15285, 3 mg/kg / 3x 0 Gy
mIgG2a iso / 3x 2 Gy
TPP15285, 3 mg/kg / 3x 2 Gy
*
*

图70

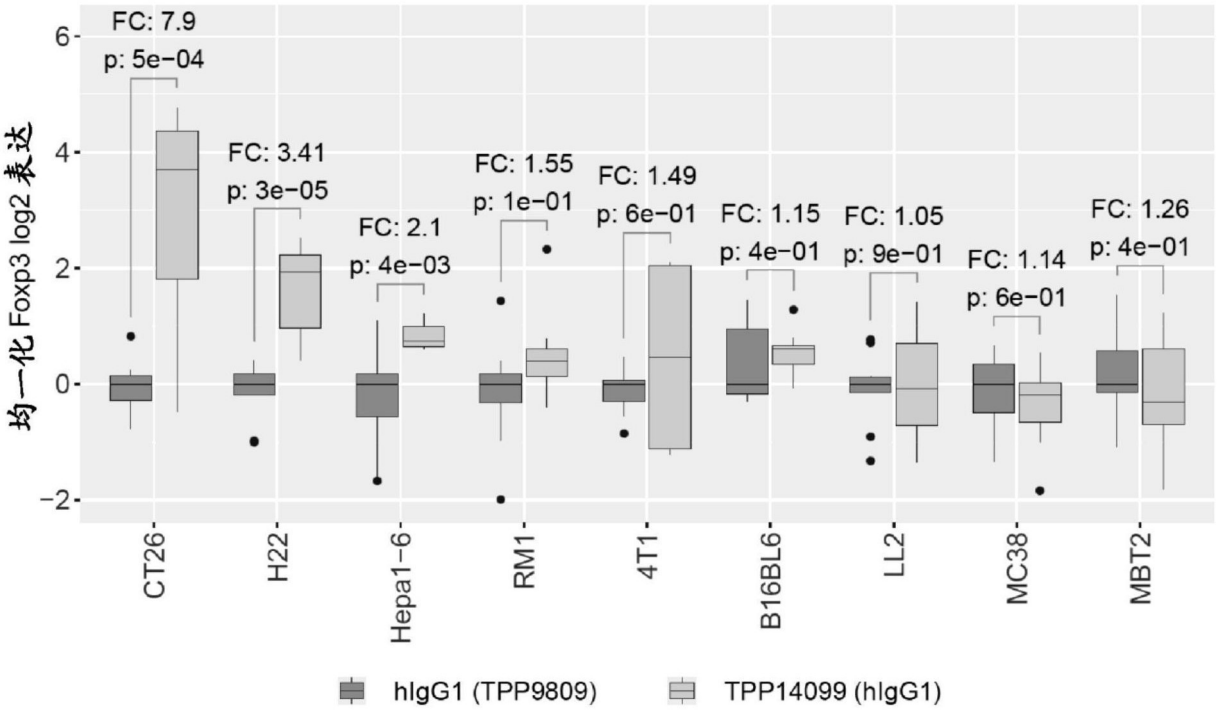

FC: 7.9
p: 5e-04
FC: 3.41
p: 3e-05
FC: 2.1
p: 4e-03
FC: 1.55
p: 1e-01
FC: 1.49
p: 6e-01
FC: 1.15
p: 4e-01
FC: 1.05
p: 9e-01
FC: 1.14
p: 6e-01
FC: 1.26
p: 4e-01
均一化 Foxp3 log2 表达
6
4
2
0
-2
CT26
H22
Hepa1-6
RM1
4T1
B16BL6
LL2
MC38
MBT2
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)

图71

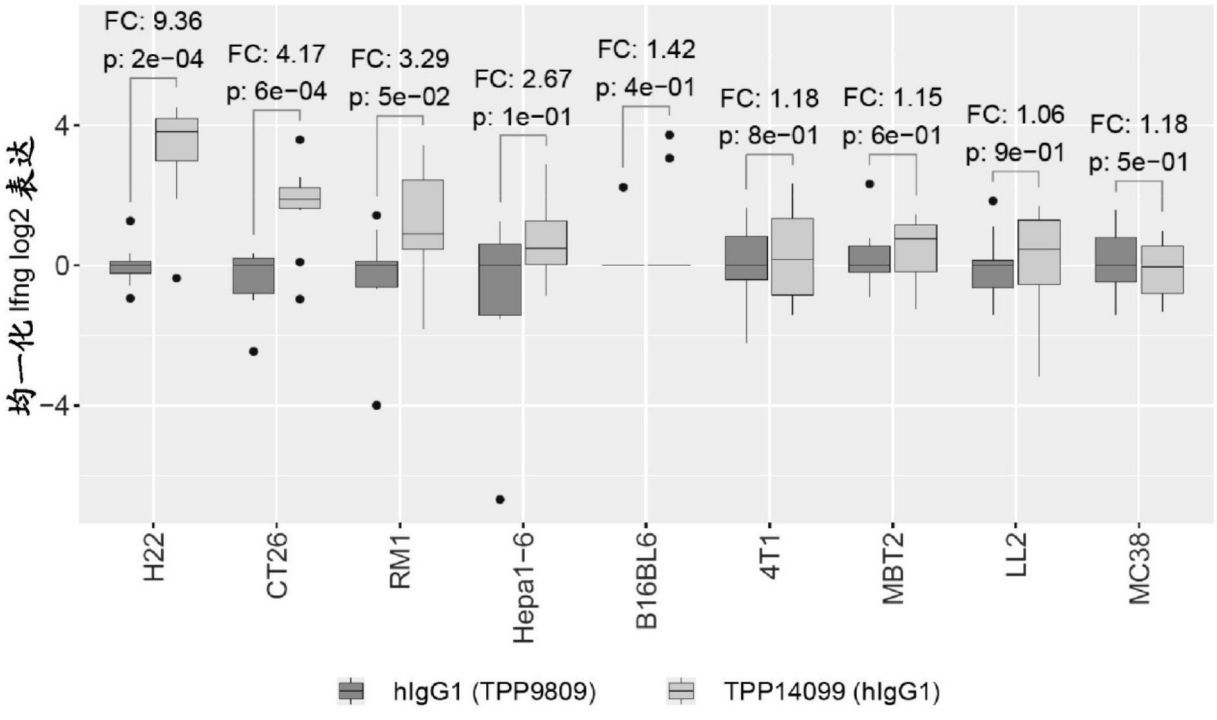

FC: 9.36
p: 2e-04
FC: 4.17
p: 6e-04
FC: 3.29
p: 5e-02
FC: 2.67
p: 1e-01
FC: 1.42
p: 4e-01
FC: 1.18
p: 8e-01
FC: 1.15
p: 6e-01
FC: 1.06
p: 9e-01
FC: 1.18
p: 5e-01
均一化 Ifng log2 表达
4
0
-4
H22
CT26
RM1
Hepa1-6
B16BL6
4T1
MBT2
LL2
MC38
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)

图72

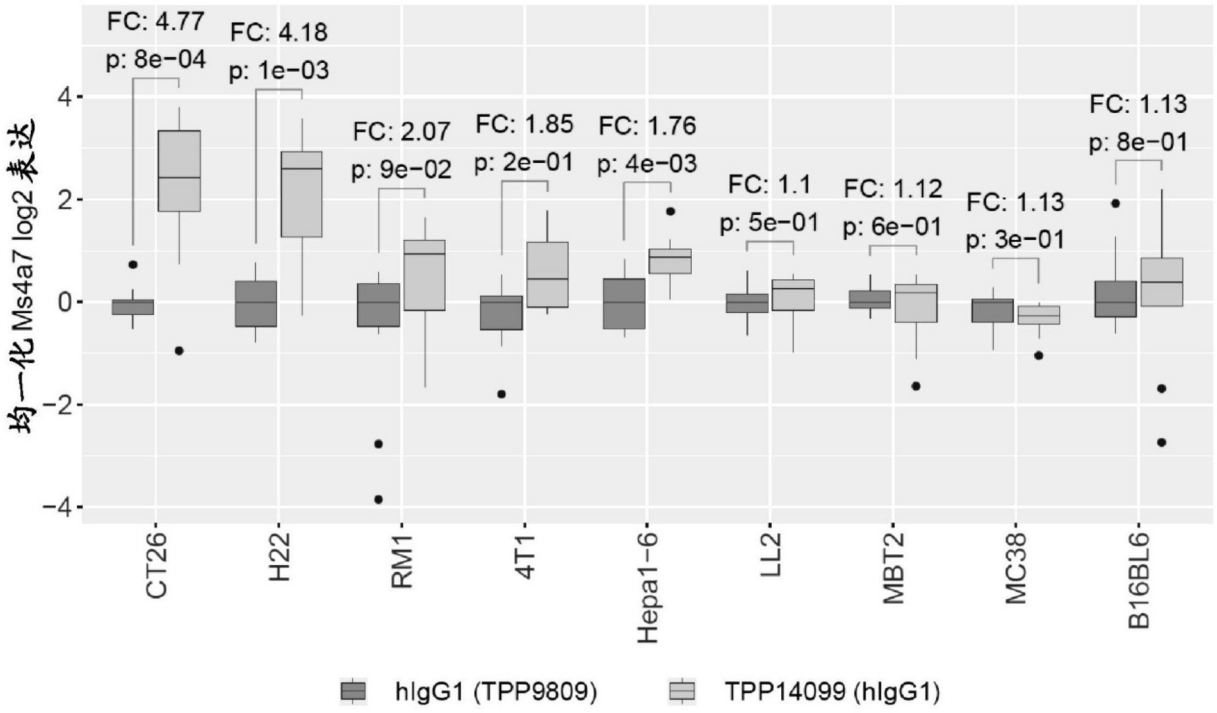

FC: 4.77
p: 8e−04
FC: 4.18
p: 1e−03
FC: 2.07
p: 9e−02
FC: 1.85
p: 2e−01
FC: 1.76
p: 4e−03
FC: 1.1
p: 5e−01
FC: 1.12
p: 6e−01
FC: 1.13
p: 3e−01
FC: 1.13
p: 8e−01
均一化 Ms4a7 log2 表达
4
2
0
−2
−4
CT26
H22
RM1
4T1
Hepa1−6
LL2
MBT2
MC38
B16BL6
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)

图73

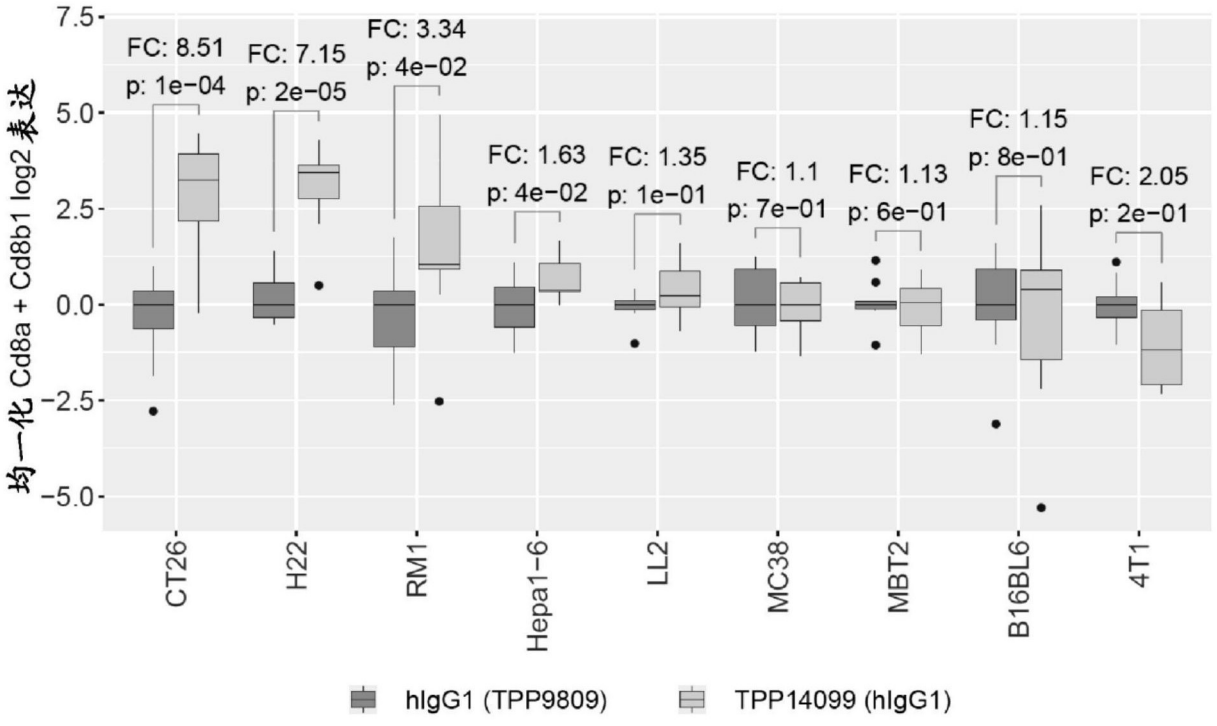

FC: 8.51
p: 1e−04
FC: 7.15
p: 2e−05
FC: 3.34
p: 4e−02
FC: 1.63
p: 4e−02
FC: 1.35
p: 1e−01
FC: 1.1
p: 7e−01
FC: 1.13
p: 6e−01
FC: 1.15
p: 8e−01
FC: 2.05
p: 2e−01
均一化 Cd8a + Cd8b1 log2 表达
7.5
5.0
2.5
0.0
−2.5
−5.0
CT26
H22
RM1
Hepa1−6
LL2
MC38
MBT2
B16BL6
4T1
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)

图74

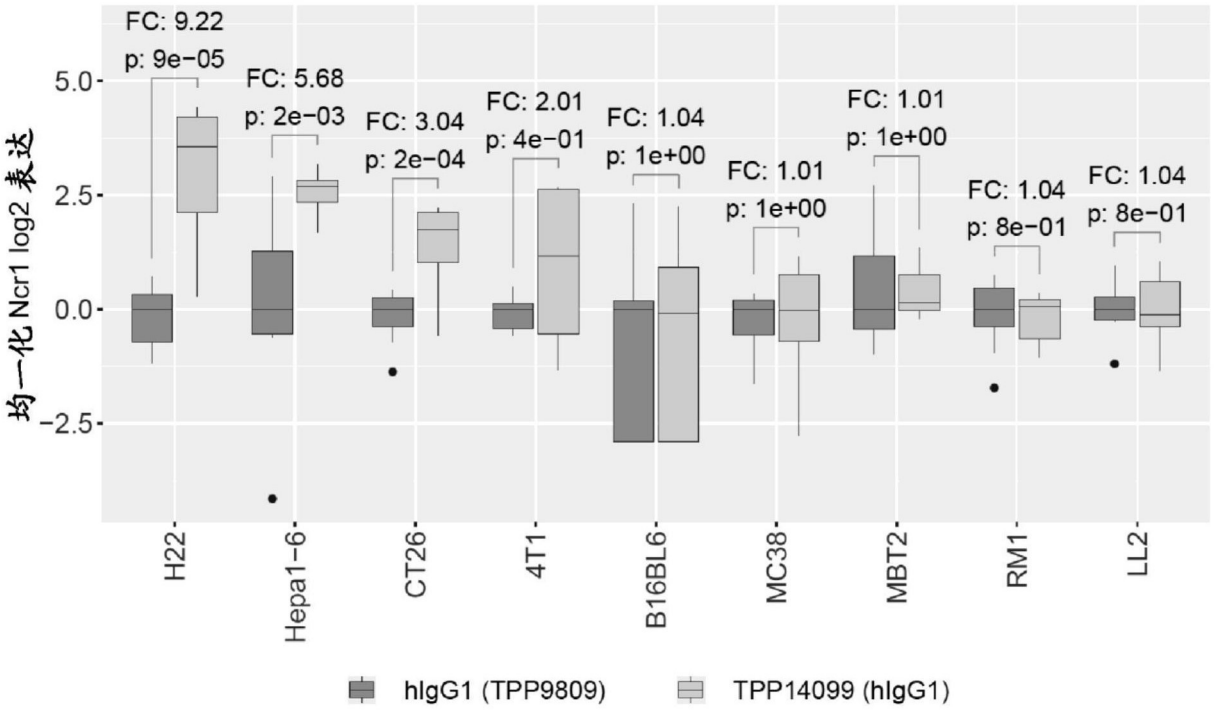

FC: 9.22
p: 9e−05
FC: 5.68
p: 2e−03
FC: 3.04
p: 2e−04
FC: 2.01
p: 4e−01
FC: 1.04
p: 1e+00
FC: 1.01
p: 1e+00
FC: 1.01
p: 1e+00
FC: 1.04
p: 8e−01
FC: 1.04
p: 8e−01
均一化 Ncr1 log2 表达
5.0
2.5
0.0
−2.5
H22
Hepa1−6
CT26
4T1
B16BL6
MC38
MBT2
RM1
LL2
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)

图75

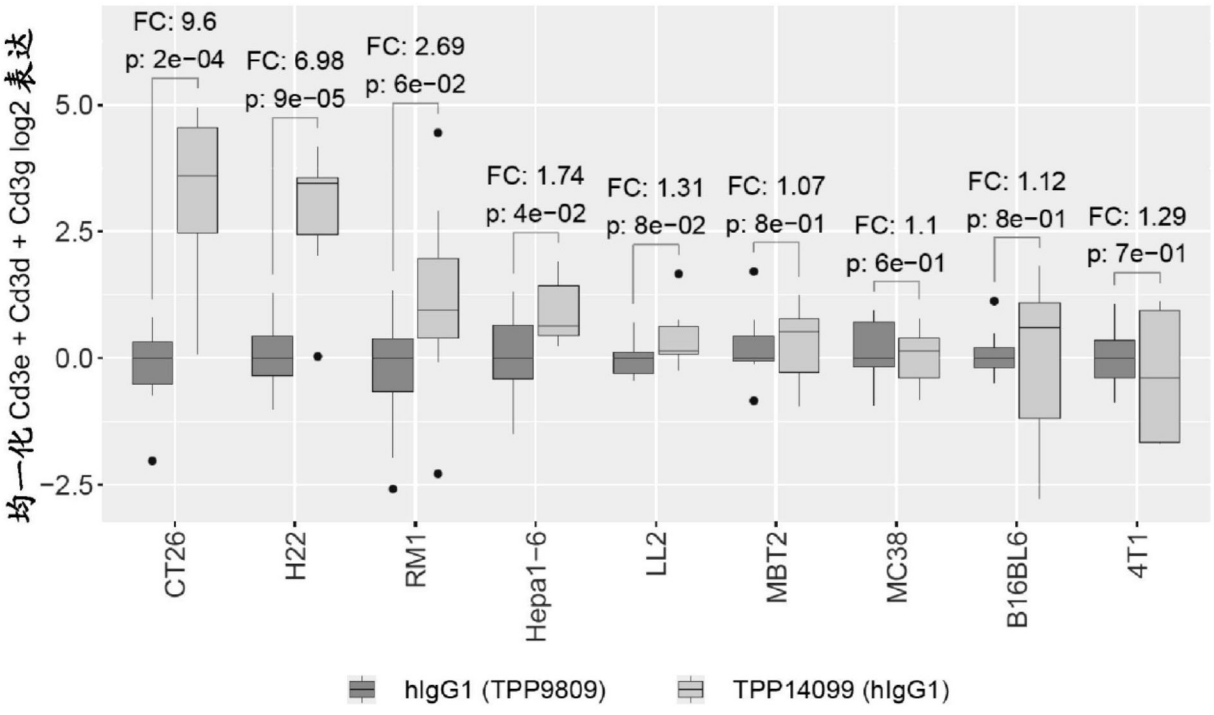

FC: 9.6
p: 2e−04
FC: 6.98
p: 9e−05
FC: 2.69
p: 6e−02
FC: 1.74
p: 4e−02
FC: 1.31
p: 8e−02
FC: 1.07
p: 8e−01
FC: 1.1
p: 6e−01
FC: 1.12
p: 8e−01
FC: 1.29
p: 7e−01
均一化 Cd3e + Cd3d + Cd3g log2 表达
5.0
2.5
0.0
−2.5
CT26
H22
RM1
Hepa1−6
LL2
MBT2
MC38
B16BL6
4T1
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)

图76

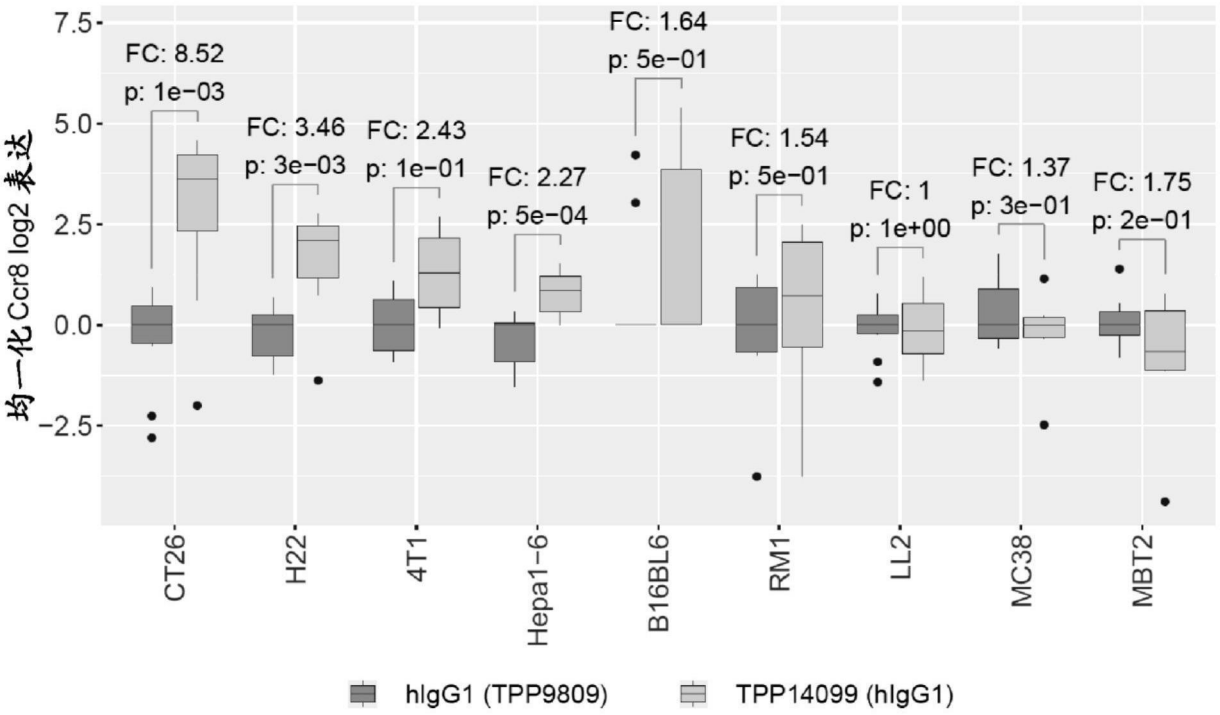

均一化Ccr8 log2 表达
7.5
5.0
2.5
0.0
-2.5
FC: 8.52
p: 1e-03
FC: 3.46
p: 3e-03
FC: 2.43
p: 1e-01
FC: 2.27
p: 5e-04
FC: 1.64
p: 5e-01
FC: 1.54
p: 5e-01
FC: 1
p: 1e+00
FC: 1.37
p: 3e-01
FC: 1.75
p: 2e-01
CT26
H22
4T1
Hepa1-6
B16BL6
RM1
LL2
MC38
MBT2
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)

图77

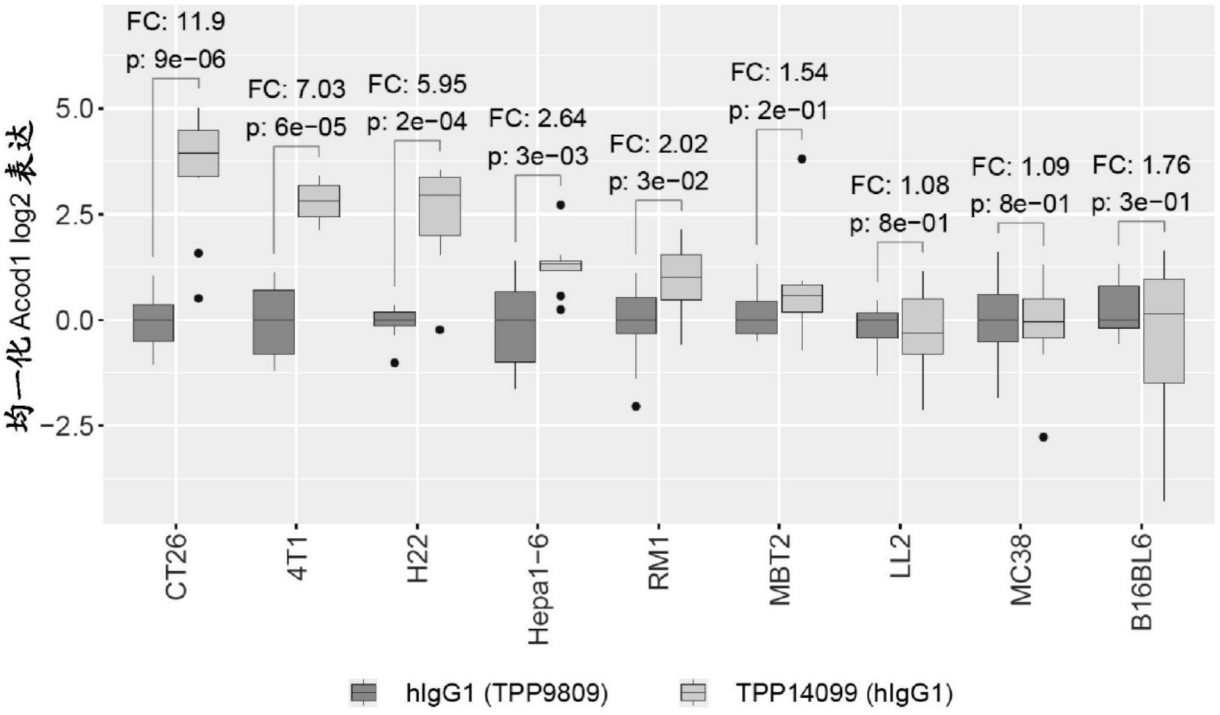

均一化 Acod1 log2 表达
5.0
2.5
0.0
-2.5
FC: 11.9
p: 9e-06
FC: 7.03
p: 6e-05
FC: 5.95
p: 2e-04
FC: 2.64
p: 3e-03
FC: 2.02
p: 3e-02
FC: 1.54
p: 2e-01
FC: 1.08
p: 8e-01
FC: 1.09
p: 8e-01
FC: 1.76
p: 3e-01
CT26
4T1
H22
Hepa1-6
RM1
MBT2
LL2
MC38
B16BL6
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)

图78a

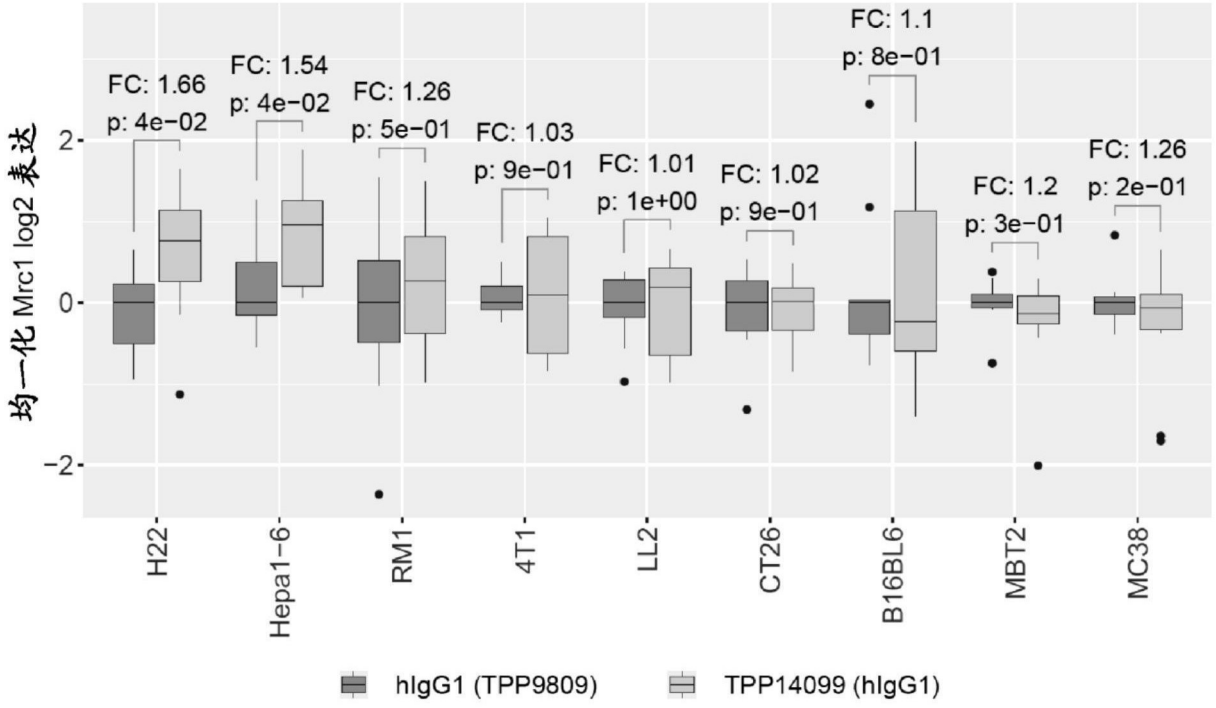

FC: 1.66
p: 4e−02
FC: 1.54
p: 4e−02
FC: 1.26
p: 5e−01
FC: 1.03
p: 9e−01
FC: 1.01
p: 1e+00
FC: 1.02
p: 9e−01
FC: 1.1
p: 8e−01
FC: 1.2
p: 3e−01
FC: 1.26
p: 2e−01
均一化 Mrc1 log2 表达
2
0
−2
H22
Hepa1−6
RM1
4T1
LL2
CT26
B16BL6
MBT2
MC38
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)

图78b

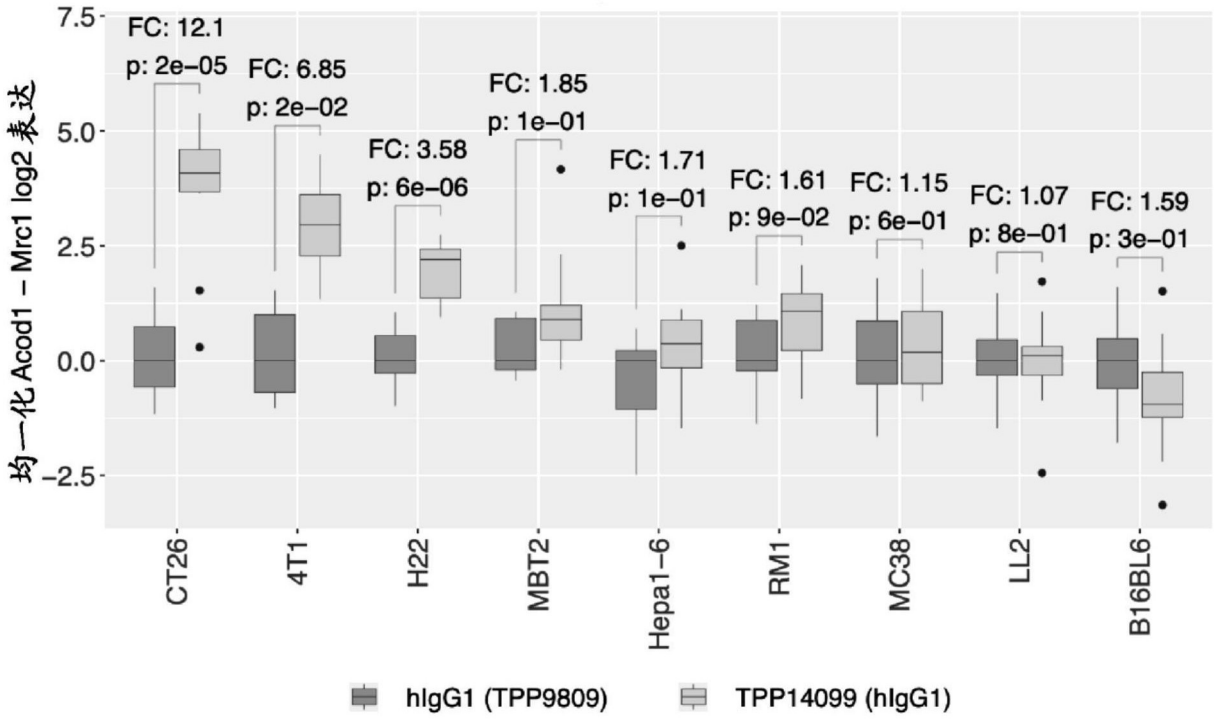

FC: 12.1
p: 2e−05
FC: 6.85
p: 2e−02
FC: 3.58
p: 6e−06
FC: 1.85
p: 1e−01
FC: 1.71
p: 1e−01
FC: 1.61
p: 9e−02
FC: 1.15
p: 6e−01
FC: 1.07
p: 8e−01
FC: 1.59
p: 3e−01
均一化 Acod1 − Mrc1 log2 表达
7.5
5.0
2.5
0.0
−2.5
CT26
4T1
H22
MBT2
Hepa1−6
RM1
MC38
LL2
B16BL6
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)

图79

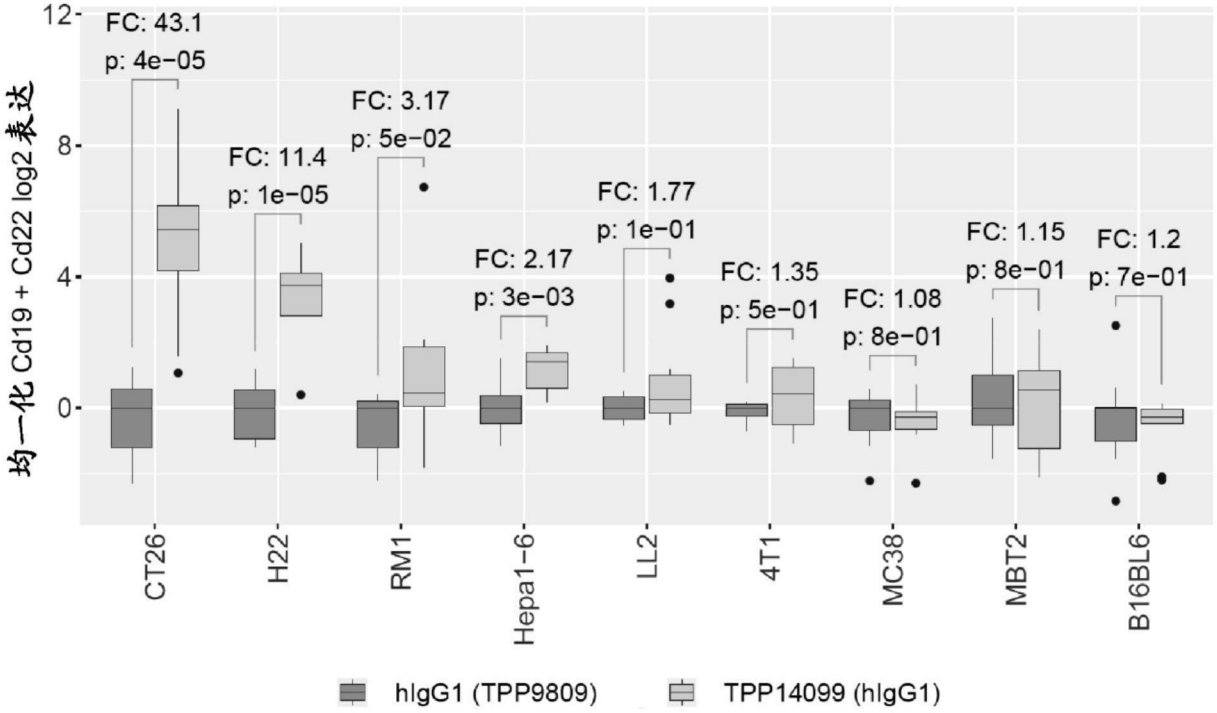

均一化 Cd19 + Cd22 log2 表达
12
8
4
0
FC: 43.1
p: 4e−05
FC: 11.4
p: 1e−05
FC: 3.17
p: 5e−02
FC: 2.17
p: 3e−03
FC: 1.77
p: 1e−01
FC: 1.35
p: 5e−01
FC: 1.08
p: 8e−01
FC: 1.15
p: 8e−01
FC: 1.2
p: 7e−01
CT26
H22
RM1
Hepa1−6
LL2
4T1
MC38
MBT2
B16BL6
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)

图80

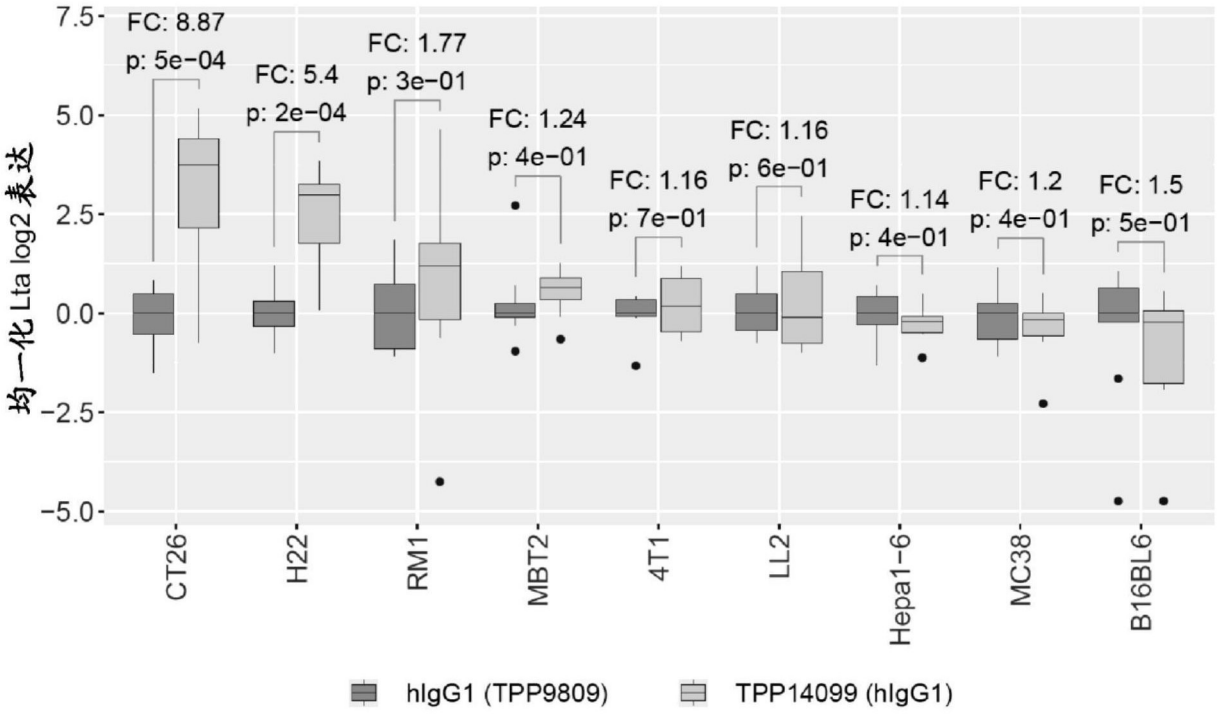

均一化 Lta log2 表达
7.5
5.0
2.5
0.0
−2.5
−5.0
FC: 8.87
p: 5e−04
FC: 5.4
p: 2e−04
FC: 1.77
p: 3e−01
FC: 1.24
p: 4e−01
FC: 1.16
p: 7e−01
FC: 1.16
p: 6e−01
FC: 1.14
p: 4e−01
FC: 1.2
p: 4e−01
FC: 1.5
p: 5e−01
CT26
H22
RM1
MBT2
4T1
LL2
Hepa1−6
MC38
B16BL6
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)

图81

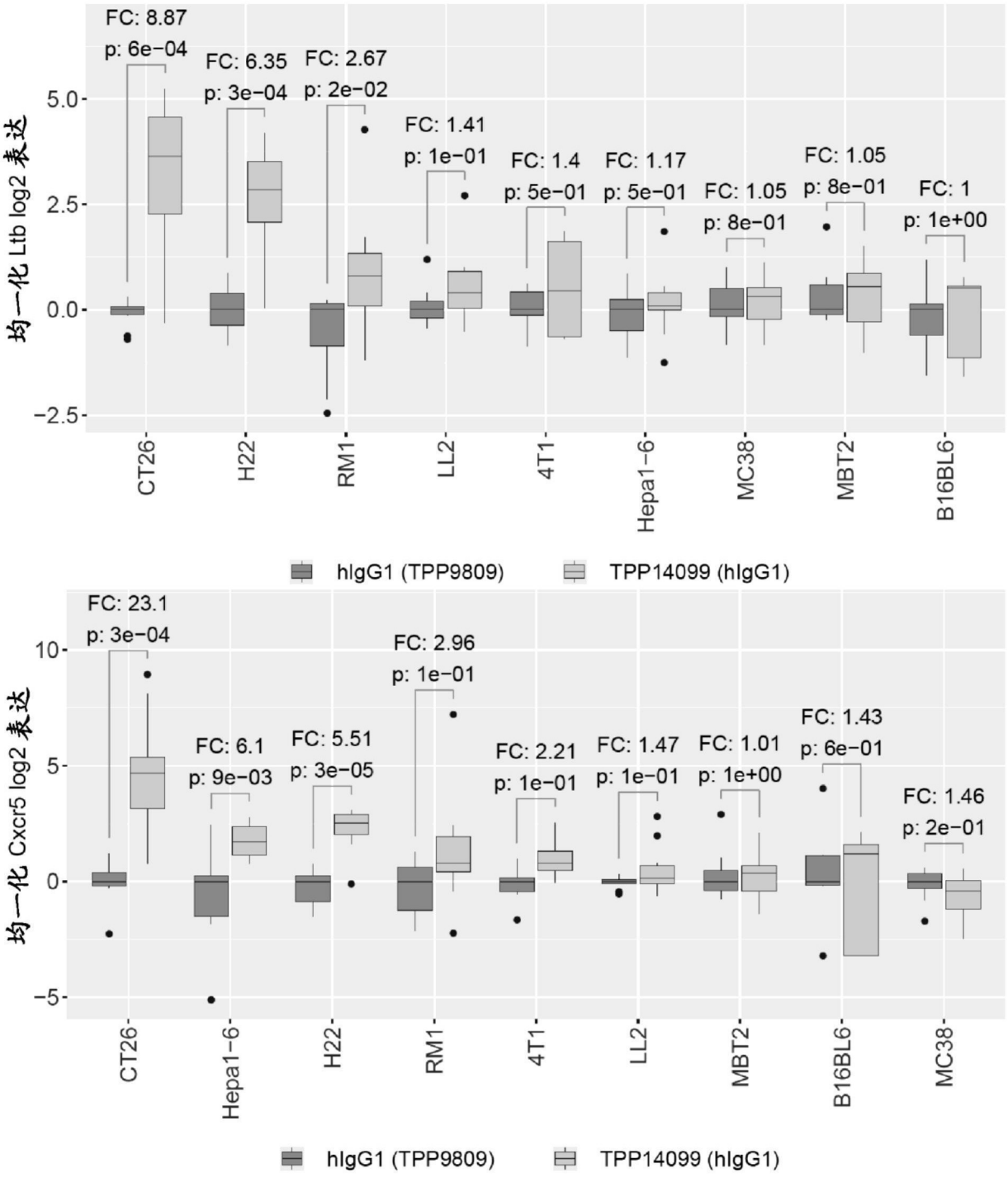

FC: 8.87
p: 6e−04
FC: 6.35
p: 3e−04
FC: 2.67
p: 2e−02
FC: 1.41
p: 1e−01
FC: 1.4
p: 5e−01
FC: 1.17
p: 5e−01
FC: 1.05
p: 8e−01
FC: 1.05
p: 8e−01
FC: 1
p: 1e+00
均一化 Ltb log2 表达
5.0
2.5
0.0
−2.5
CT26
H22
RM1
LL2
4T1
Hepa1−6
MC38
MBT2
B16BL6
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)
FC: 23.1
p: 3e−04
FC: 6.1
p: 9e−03
FC: 5.51
p: 3e−05
FC: 2.96
p: 1e−01
FC: 2.21
p: 1e−01
FC: 1.47
p: 1e−01
FC: 1.01
p: 1e+00
FC: 1.43
p: 6e−01
FC: 1.46
p: 2e−01
均一化 Cxcr5 log2 表达
10
5
0
−5
CT26
Hepa1−6
H22
RM1
4T1
LL2
MBT2
B16BL6
MC38
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)

图81(续)

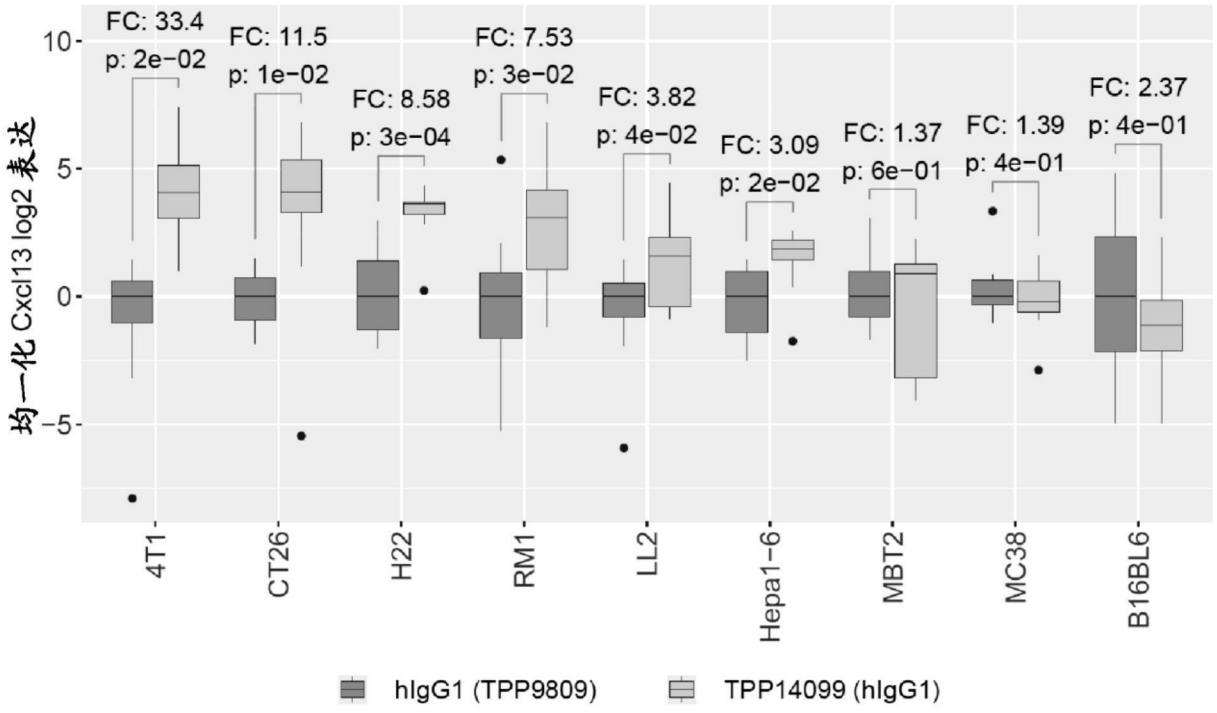

FC: 33.4
p: 2e-02
FC: 11.5
p: 1e-02
FC: 8.58
p: 3e-04
FC: 7.53
p: 3e-02
FC: 3.82
p: 4e-02
FC: 3.09
p: 2e-02
FC: 1.37
p: 6e-01
FC: 1.39
p: 4e-01
FC: 2.37
p: 4e-01
均一化 Cxcl13 log2 表达
10
5
0
-5
4T1
CT26
H22
RM1
LL2
Hepa1-6
MBT2
MC38
B16BL6
hIgG1 (TPP9809)
TPP14099 (hIgG1)

图81(续)

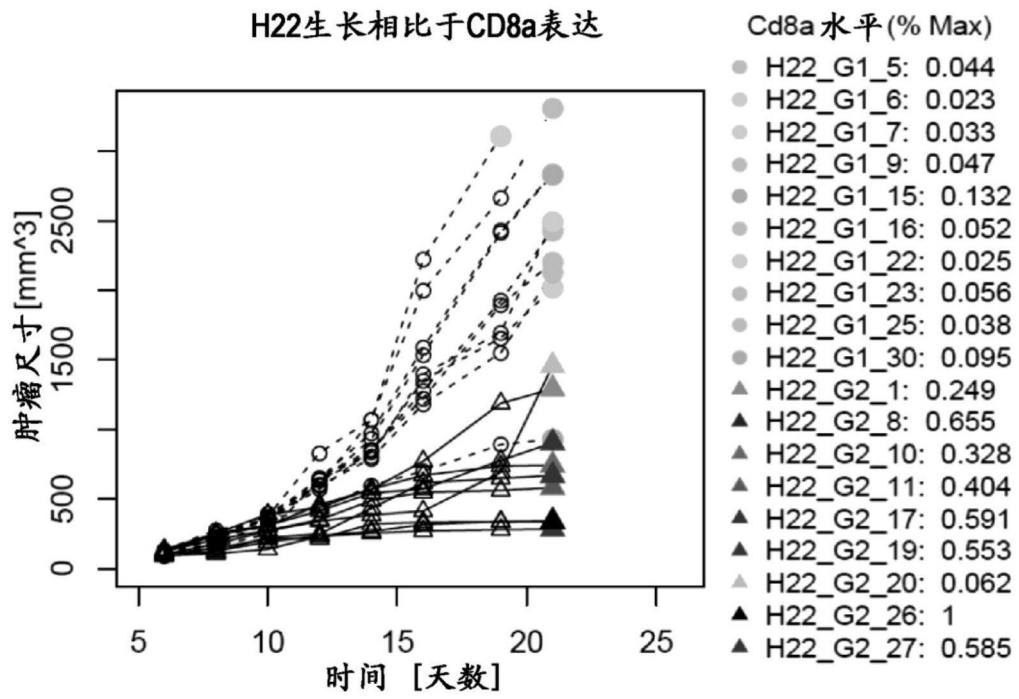

H22生长相比于CD8a表达
肿瘤尺寸[mm^3]
0
500
1500
2500
5
10
15
20
25
时间 [天数]
Cd8a 水平(% Max)
H22_G1_5: 0.044
H22_G1_6: 0.023
H22_G1_7: 0.033
H22_G1_9: 0.047
H22_G1_15: 0.132
H22_G1_16: 0.052
H22_G1_22: 0.025
H22_G1_23: 0.056
H22_G1_25: 0.038
H22_G1_30: 0.095
H22_G2_1: 0.249
H22_G2_8: 0.655
H22_G2_10: 0.328
H22_G2_11: 0.404
H22_G2_17: 0.591
H22_G2_19: 0.553
H22_G2_20: 0.062
H22_G2_26: 1
H22_G2_27: 0.585

图82

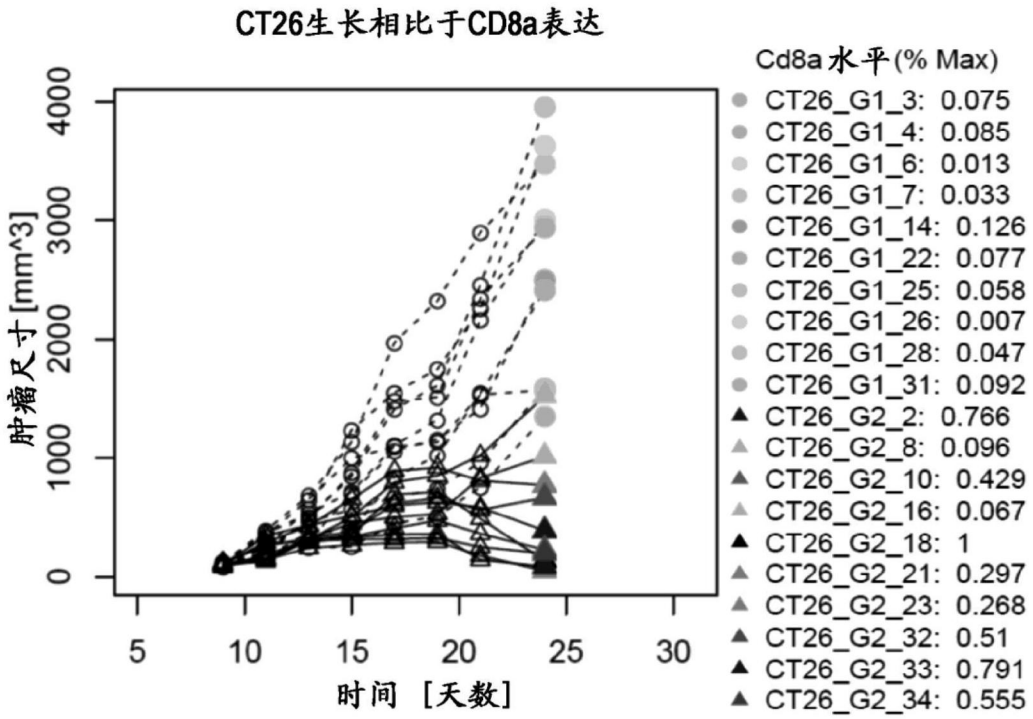

CT26生长相比于CD8a表达
肿瘤尺寸[mm^3]
0
1000
2000
3000
4000
5
10
15
20
25
30
时间 [天数]
Cd8a水平(% Max)
CT26_G1_3: 0.075
CT26_G1_4: 0.085
CT26_G1_6: 0.013
CT26_G1_7: 0.033
CT26_G1_14: 0.126
CT26_G1_22: 0.077
CT26_G1_25: 0.058
CT26_G1_26: 0.007
CT26_G1_28: 0.047
CT26_G1_31: 0.092
CT26_G2_2: 0.766
CT26_G2_8: 0.096
CT26_G2_10: 0.429
CT26_G2_16: 0.067
CT26_G2_18: 1
CT26_G2_21: 0.297
CT26_G2_23: 0.268
CT26_G2_32: 0.51
CT26_G2_33: 0.791
CT26_G2_34: 0.555

图82(续)

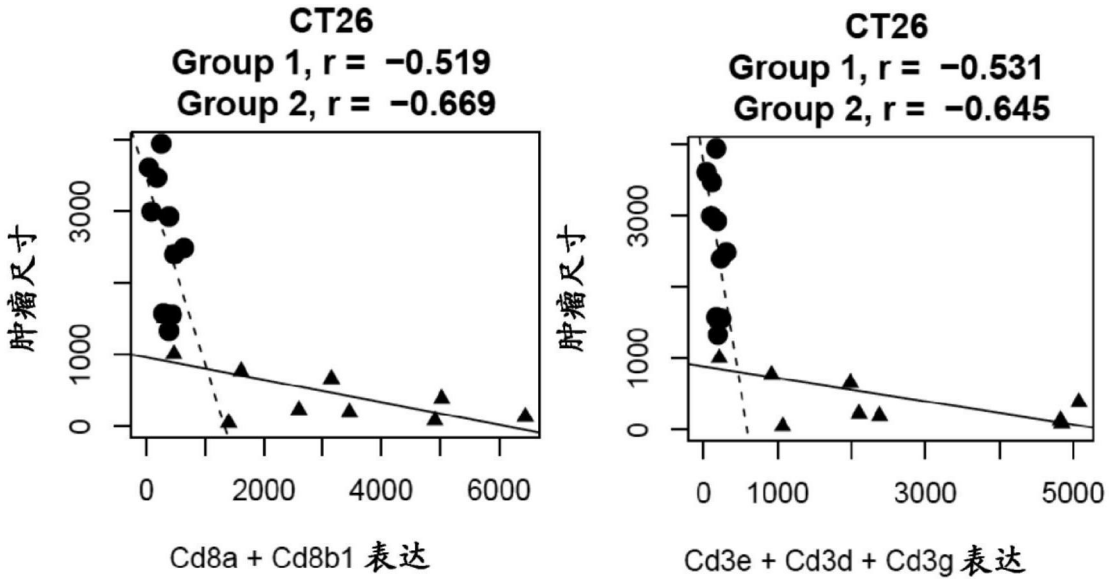

CT26
Group 1, r = −0.519
Group 2, r = −0.669
肿瘤尺寸
0
1000
3000
0
2000
4000
6000
Cd8a + Cd8b1 表达
CT26
Group 1, r = −0.531
Group 2, r = −0.645
肿瘤尺寸
0
1000
3000
0
1000
3000
5000
Cd3e + Cd3d + Cd3g 表达

图83

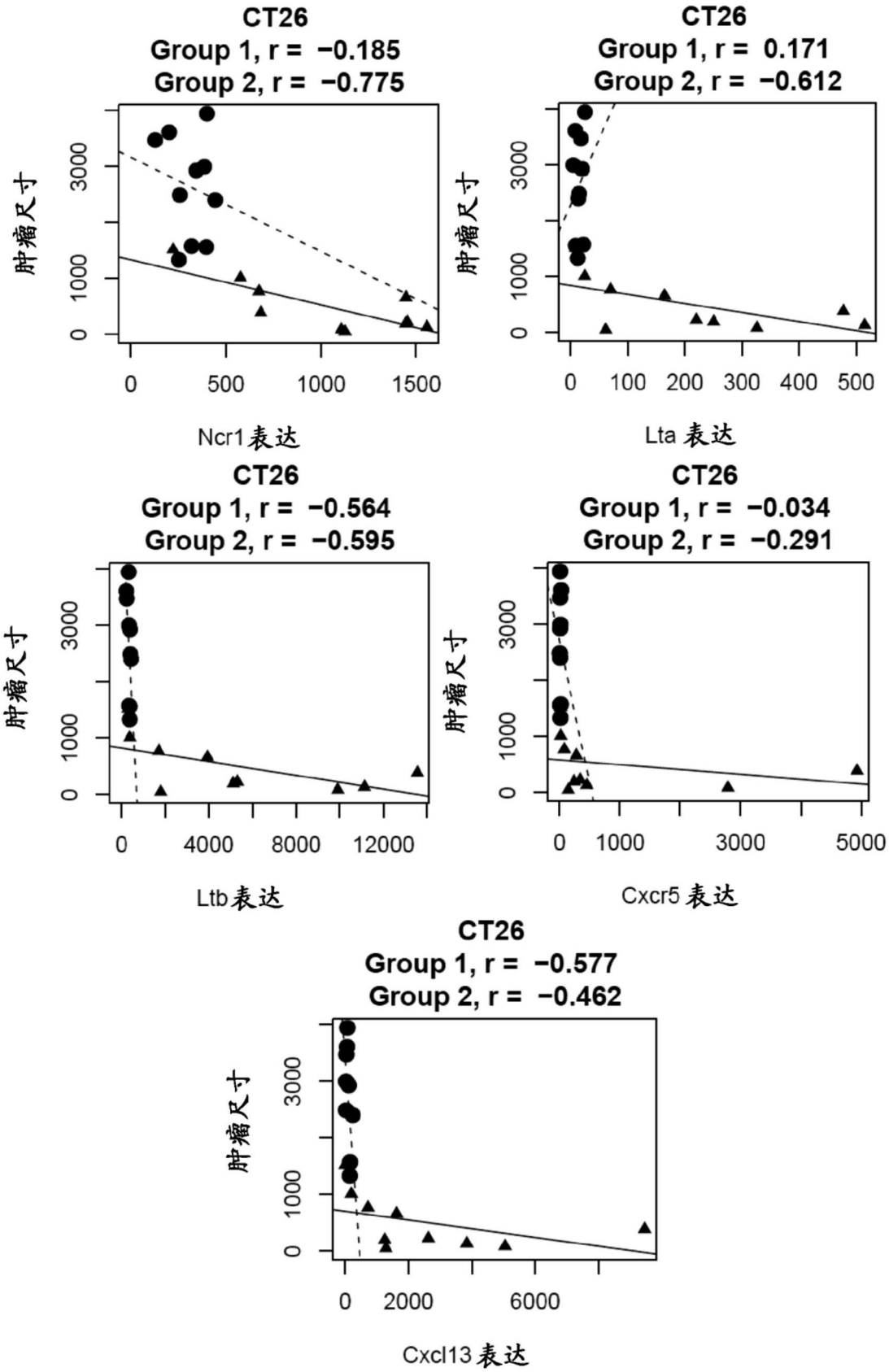

CT26
Group 1, r = −0.185
Group 2, r = −0.775
肿瘤尺寸
Ncr1表达
CT26
Group 1, r = 0.171
Group 2, r = −0.612
肿瘤尺寸
Lta 表达
CT26
Group 1, r = −0.564
Group 2, r = −0.595
肿瘤尺寸
Ltb表达
CT26
Group 1, r = −0.034
Group 2, r = −0.291
肿瘤尺寸
Cxcr5 表达
CT26
Group 1, r = −0.577
Group 2, r = −0.462
肿瘤尺寸
Cxcl13 表达

图83(续)

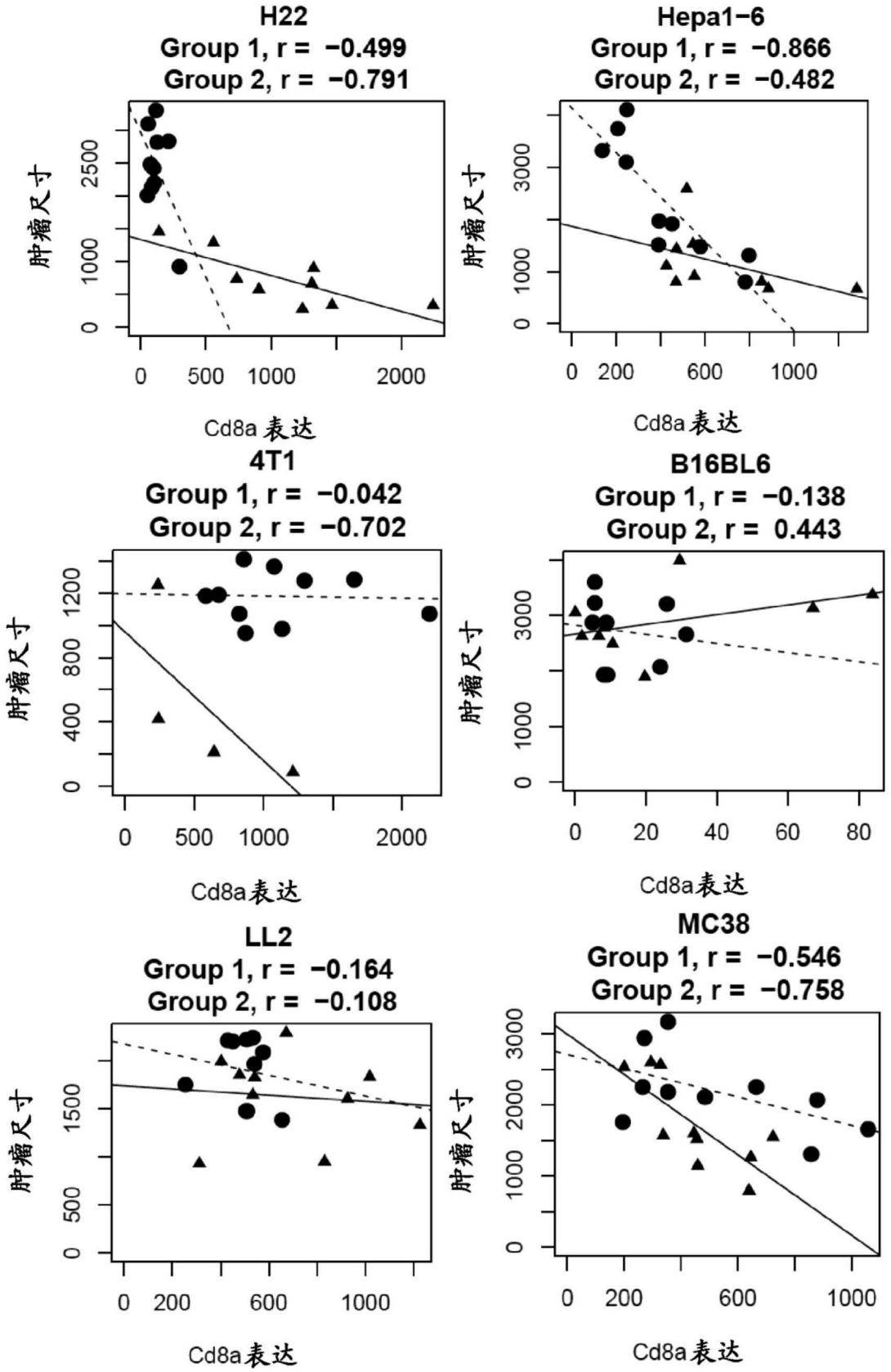

H22
Group 1, r = −0.499
Group 2, r = −0.791
肿瘤尺寸
Cd8a 表达
Hepa1−6
Group 1, r = −0.866
Group 2, r = −0.482
肿瘤尺寸
Cd8a表达
4T1
Group 1, r = −0.042
Group 2, r = −0.702
肿瘤尺寸
Cd8a表达
B16BL6
Group 1, r = −0.138
Group 2, r = 0.443
肿瘤尺寸
Cd8a表达
LL2
Group 1, r = −0.164
Group 2, r = −0.108
肿瘤尺寸
Cd8a表达
MC38
Group 1, r = −0.546
Group 2, r = −0.758
肿瘤尺寸
Cd8a表达

图84

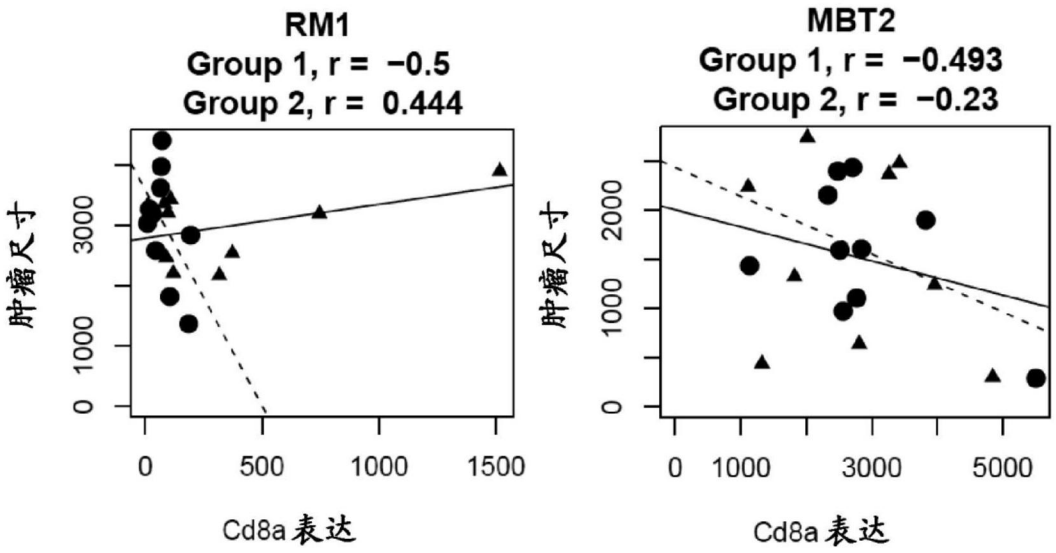

RM1
Group 1, r = −0.5
Group 2, r = 0.444
肿瘤尺寸
0
1000
3000
0
500
1000
1500
Cd8a 表达
MBT2
Group 1, r = −0.493
Group 2, r = −0.23
肿瘤尺寸
0
1000
2000
0
1000
3000
5000
Cd8a 表达

图84(续)

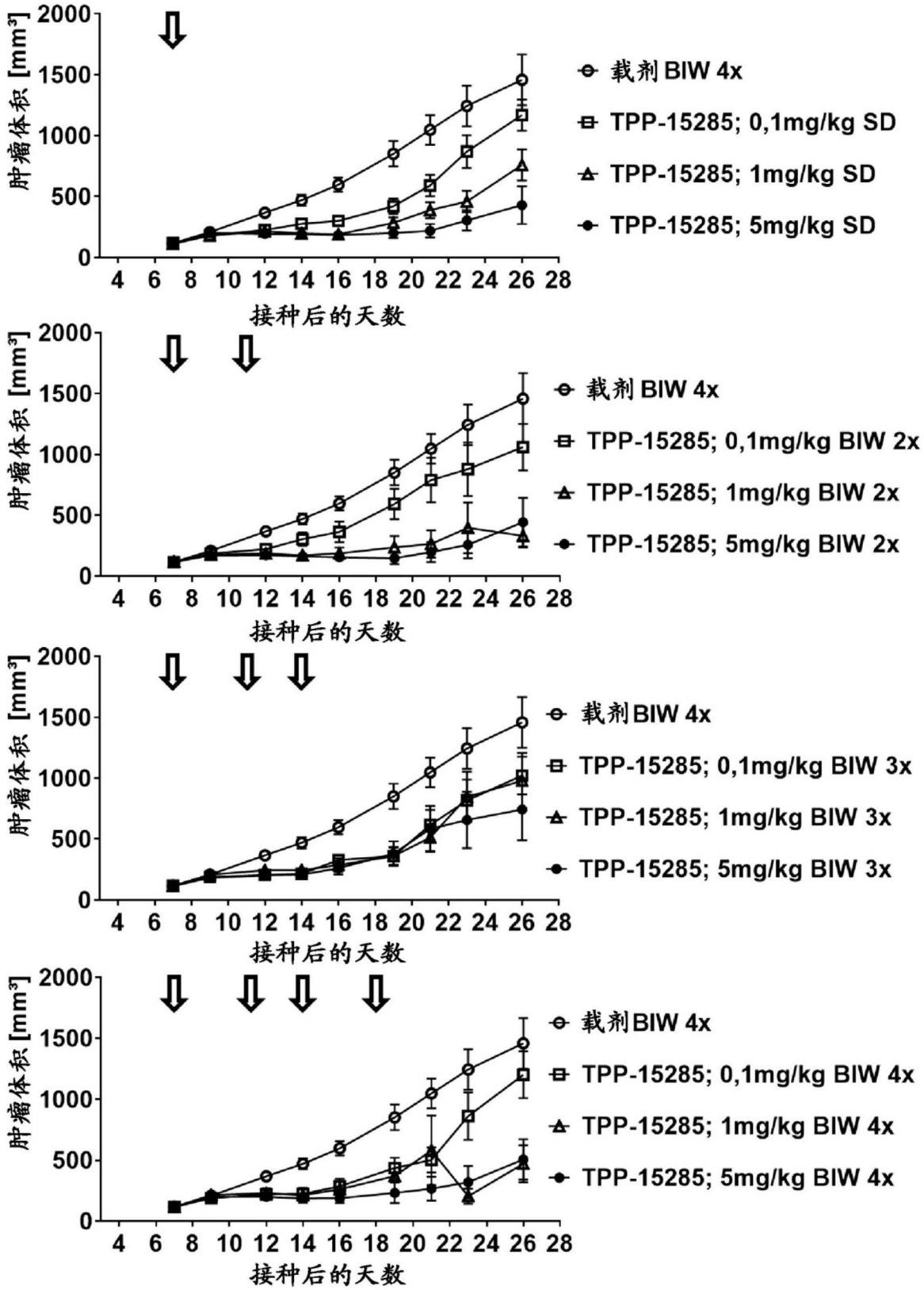

肿瘤体积 [mm³]
2000
1500
1000
500
0
4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28
接种后的天数
载剂 BIW 4x
TPP-15285; 0,1mg/kg SD
TPP-15285; 1mg/kg SD
TPP-15285; 5mg/kg SD
肿瘤体积 [mm³]
2000
1500
1000
500
0
4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28
接种后的天数
载剂 BIW 4x
TPP-15285; 0,1mg/kg BIW 2x
TPP-15285; 1mg/kg BIW 2x
TPP-15285; 5mg/kg BIW 2x
肿瘤体积 [mm³]
2000
1500
1000
500
0
4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28
接种后的天数
载剂BIW 4x
TPP-15285; 0,1mg/kg BIW 3x
TPP-15285; 1mg/kg BIW 3x
TPP-15285; 5mg/kg BIW 3x
肿瘤体积 [mm³]
2000
1500
1000
500
0
4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28
接种后的天数
载剂BIW 4x
TPP-15285; 0,1mg/kg BIW 4x
TPP-15285; 1mg/kg BIW 4x
TPP-15285; 5mg/kg BIW 4x

图85

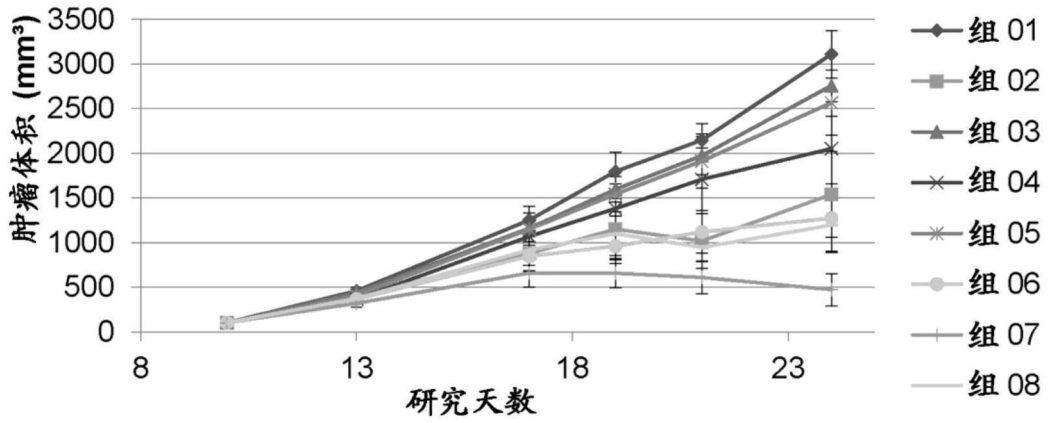

肿瘤体积 (mm³)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
8
13
18
23
研究天数
组 01
组 02
组 03
组 04
组 05
组 06
组 07
组 08

图86

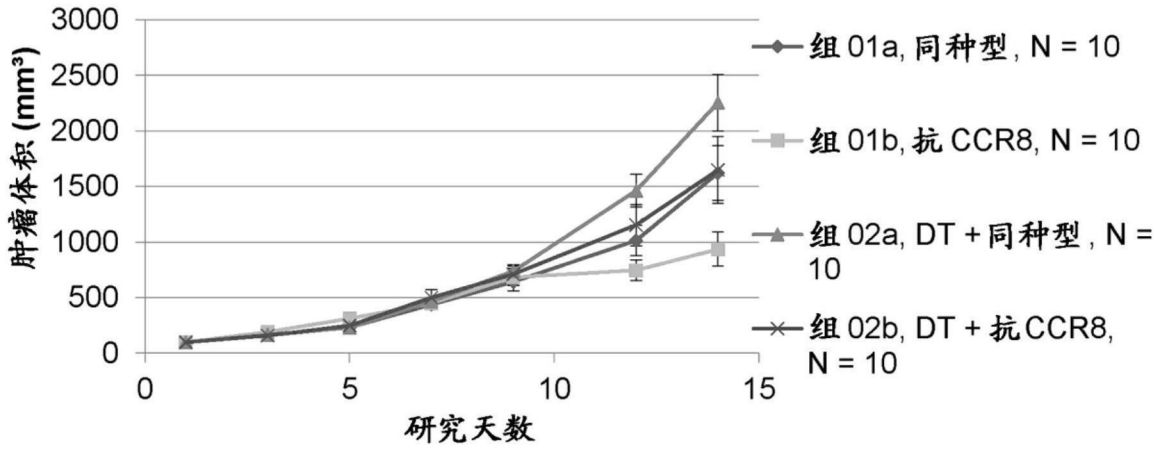

肿瘤体积 (mm³)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
研究天数
组 01a, 同种型, N = 10
组 01b, 抗 CCR8, N = 10
组 02a, DT + 同种型, N = 10
组 02b, DT + 抗CCR8, N = 10

图87

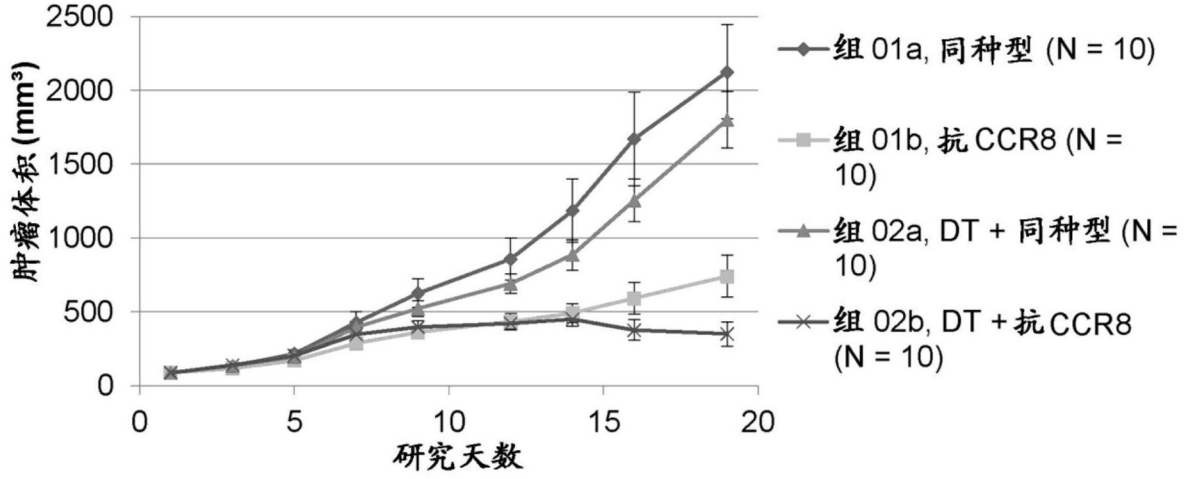

肿瘤体积 (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
研究天数
组 01a, 同种型 (N = 10)
组 01b, 抗 CCR8 (N = 10)
组 02a, DT + 同种型 (N = 10)
组 02b, DT + 抗CCR8 (N = 10)

图88

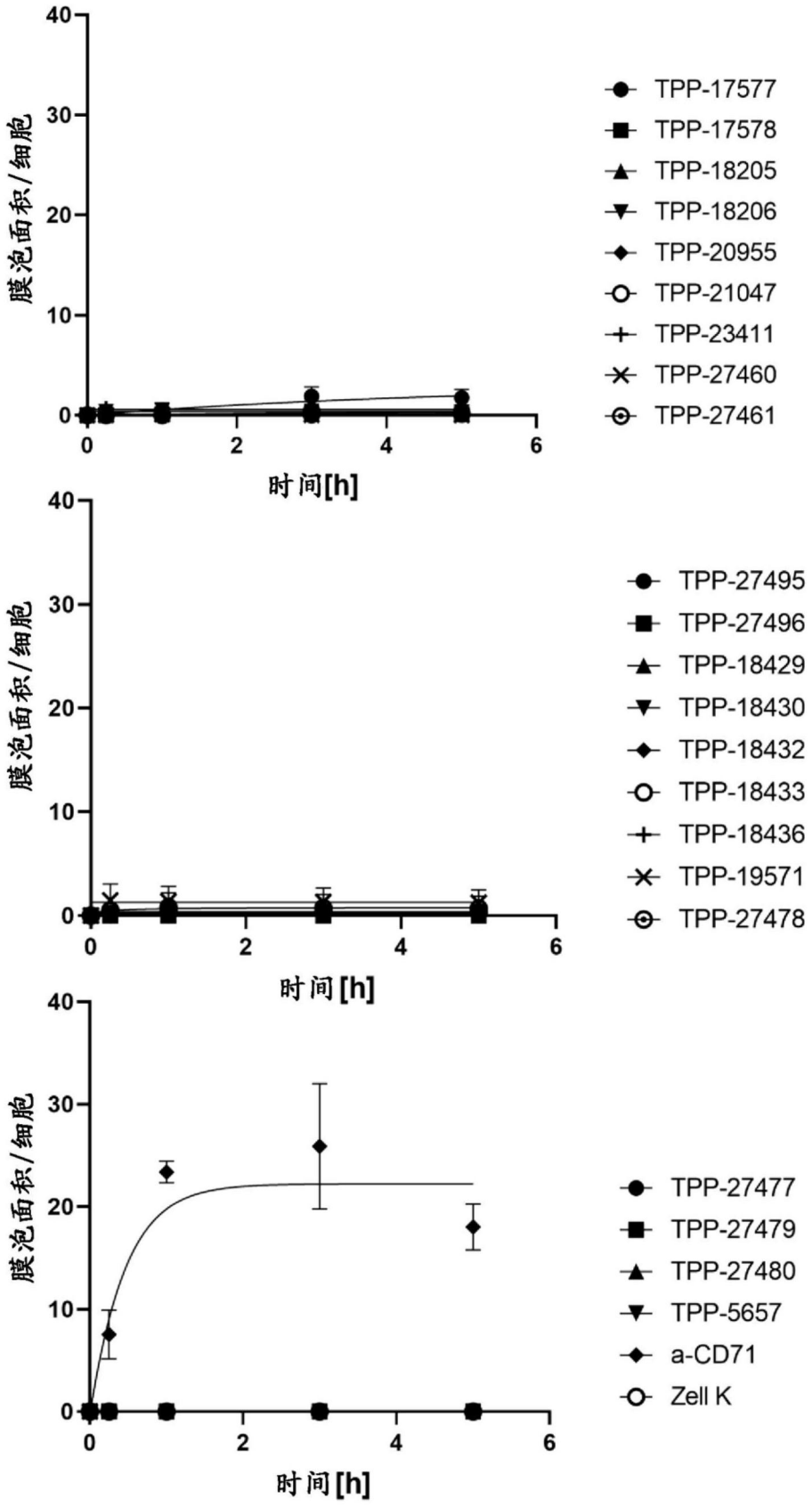

膜泡面积/细胞
时间[h]
TPP-17577
TPP-17578
TPP-18205
TPP-18206
TPP-20955
TPP-21047
TPP-23411
TPP-27460
TPP-27461
膜泡面积/细胞
时间[h]
TPP-27495
TPP-27496
TPP-18429
TPP-18430
TPP-18432
TPP-18433
TPP-18436
TPP-19571
TPP-27478
膜泡面积/细胞
时间[h]
TPP-27477
TPP-27479
TPP-27480
TPP-5657
a-CD71
Zell K

图89