



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118176210 A

(43) 申请公布日 2024.06.11

(21) 申请号 202280069781.2

(22) 申请日 2022.08.19

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2021/113913 2021.08.20 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/113739 2022.08.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/020621 EN 2023.02.23

(71) 申请人 高诚生物医药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 J·普里让

N·A·A·贝尔特拉米内尔

S·艾洛泽 F·艾德里安

L·施维泽 Y-Y·陆

R·B·富尔顿

(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

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G12P 21/08 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书34页 附图19页

(54) 发明名称

抗CCR8抗体及其用途

(57) 摘要

本文描述了抗CCR8抗体及其抗原结合片段。本文还描述了编码抗CCR8抗体及其抗原结合片段的核酸,包含抗CCR8抗体及其抗原结合片段的组合物,生产抗CCR8抗体及其抗原结合片段的方法以及使用抗CCR8抗体及其抗原结合片段在有此需要的受试者中治疗或预防癌症的用途。

1. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含重链互补性决定区1 (HCDR1)、HCDR2、HCDR3、轻链互补性决定区1 (LCDR1)、LCDR2和LCDR3,其具有以下多肽序列:

- (1) 分别为SEQ ID NO: 1、2、3、4、5和6;
- (2) 分别为SEQ ID NO: 13、2、14、4、28和6;
- (3) 分别为SEQ ID NO: 13、2、15、4、5和6;
- (4) 分别为SEQ ID NO: 16、17、18、29、30和6;
- (5) 分别为SEQ ID NO: 19、20、21、4、5和6;
- (6) 分别为SEQ ID NO: 22、23、24、31、5和32;或者
- (7) 分别为SEQ ID NO: 25、26、27、33、34和35;

其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合趋化因子 (C-C基序) 受体8 (CCR8), 优选人CCR8。

2. 根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO: 7、36、38、40、42、44或46至少95%相同的多肽序列,或轻链可变区,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO: 8、37、39、41、43、45或47至少95%相同的多肽序列。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含:

- (1) 具有SEQ ID NO: 7的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO: 8的多肽序列的轻链可变区;
- (2) 具有SEQ ID NO: 36的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO: 37的多肽序列的轻链可变区;
- (3) 具有SEQ ID NO: 38的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO: 39的多肽序列的轻链可变区;
- (4) 具有SEQ ID NO: 40的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO: 41的多肽序列的轻链可变区;
- (5) 具有SEQ ID NO: 42的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO: 43的多肽序列的轻链可变区;
- (6) 具有SEQ ID NO: 44的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO: 45的多肽序列的轻链可变区;或者
- (7) 具有SEQ ID NO: 46的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO: 47的多肽序列的轻链可变区。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是嵌合的和/或人的或人源化的。

5. 根据权利要求4所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链互补性决定区1 (HCDR1)、HCDR2、HCDR3、轻链互补性决定区1 (LCDR1)、LCDR2和LCDR3,其具有以下多肽序列:

- (1) 分别为SEQ ID NO: 1、48、49、50、51和6;
- (2) 分别为SEQ ID NO: 1、2、49、4、5和6;
- (3) 分别为SEQ ID NO: 1、2、49、50、51和6;
- (4) 分别为SEQ ID NO: 1、2、3、4、5和6;或者

(5) 分别为SEQ ID NO:1、48、49、50、51和6。

6. 根据权利要求5所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:9、52、53、54、55、56、57、58、59或60至少95%相同的多肽序列,或轻链可变区,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:10、61、62或63至少95%相同的多肽序列。

7. 根据权利要求6所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

(1) 具有SEQ ID NO:9的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10的多肽序列的轻链可变区;

(2) 具有SEQ ID NO:52的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:63的多肽序列的轻链可变区;

(3) 具有SEQ ID NO:52的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10的多肽序列的轻链可变区;

(4) 具有SEQ ID NO:53的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10的多肽序列的轻链可变区;

(5) 具有SEQ ID NO:54的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:63的多肽序列的轻链可变区;或者

(6) 具有SEQ ID NO:59的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:62的多肽序列的轻链可变区。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段能够通过抗体依赖性细胞毒性(ADCC);抗体依赖性细胞吞噬作用(ADPC)诱导效应物介导的肿瘤细胞裂解;和/或介导缀合药物的募集;和/或与另一种具有肿瘤杀伤作用的mAb或其抗原结合片段形成双特异性抗体。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合食蟹猴CCR8。

10. 一种双特异性抗体或其抗原结合片段,其包含权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

11. 一种分离的核酸,其编码权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

12. 一种分离的核酸,其编码权利要求10所述的双特异性抗体或其抗原结合片段。

13. 一种载体,其包含权利要求11或权利要求12所述的分离的核酸。

14. 一种宿主细胞,其包含权利要求13所述的载体。

15. 一种药物组合物,其包含权利要求1-9中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段或权利要求9所述的双特异性抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

16. 一种在有此需要的受试者中靶向癌细胞表面上的CCR8和/或治疗癌症的方法,其包括向所述受试者施用权利要求15所述的药物组合物。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述癌症是实体瘤,优选具有浸润性T细胞的实体瘤,更优选具有浸润性T reg细胞的实体瘤,更优选具有表达CCR8的高抑制性T reg细胞的实体瘤,最优选具有发生了自然杀伤(NK)细胞浸润的过表达CCR8的浸润性高抑制性Treg

细胞的实体瘤。

18. 根据权利要求16或权利要求17所述的方法,其中所述癌症选自以下:肺癌、头颈癌、食管癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、肾癌和黑色素瘤。

19. 根据权利要求16-18中任一项所述的方法,其中所述受试者包含表达CCR8的Treg细胞。

20. 一种生产权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者权利要求10所述的双特异性抗体或其抗原结合片段的方法,其包括在生产单克隆抗体或其抗原结合片段或者双特异性抗体或其抗原结合片段的条件下培养包含编码所述单克隆抗体或其抗原结合片段或者所述双特异性抗体或其抗原结合片段的核酸的细胞,并且从所述细胞或培养物中回收所述单克隆抗体或其抗原结合片段或者所述双特异性抗体或其抗原结合片段。

21. 一种生产包含权利要求1-9中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者权利要求10所述的药物组合物的方法,其包括将所述单克隆抗体或其抗原结合片段或者所述双特异性抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体组合以获得所述药物组合物。

22. 一种确定受试者中CCR8的水平的方法,所述方法包括:

- a. 从所述受试者获得样品;
- b. 将所述样品与权利要求1-9中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段接触;和
- c. 确定所述受试者中CCR8的水平。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述样品是组织样品或血液样品,任选地其中所述组织样品是癌症组织样品。

24. 根据权利要求22所述的方法,其中所述样品包含Treg细胞。

抗CCR8抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求根据35 U.S.C. §119(e)对2021年8月20日提交的、现已撤回的国际专利申请号PCT/CN2021/113913享有优先权。在先申请公开的内容被认为是本公开内容的一部分,并且通过引用将其整体并入本申请的公开内容中。

技术领域

[0003] 本发明涉及分离的抗趋化因子(C-C基序)受体8(CCR8)单克隆抗体或其抗原结合片段,编码所述抗体的核酸和表达载体,含有所述载体的重组细胞以及包含所述抗体的组合物。还提供了制备所述抗体的方法,以及使用所述抗体治疗包括癌症和/或相关并发症在内的疾病的方法。

[0004] 以电子方式提交的序列表的引用

[0005] 本申请包含一个序列表,其通过EFS-Web以电子方式提交,作为ASCII形式的序列表,文件名为“065798.6W01序列表”,创建日期为2021年8月6日,大小为49kb。通过EFS-Web提交的序列表是说明书的一部分并且其整体并入本文。

背景技术

[0006] CCR8是在CCL1或CCL18梯度下介导细胞迁移的趋化因子受体(Islam等, JEM 210(10):1889-1898(2013))。最近,CCR8被鉴定为人类癌症中肿瘤浸润调节性T细胞(TITR)的高度特异性细胞表面标志物,与循环中的Treg相比,其在肿瘤内的Treg中的表达显著更高,而在其他T细胞群(分别为细胞毒性T细胞或效应T细胞)中没有表达或有非常低的表达。此外,CCR8主要在高免疫抑制Treg上表达,该Treg表达FoxP3高、CD25高、TIGIT+、LAG3+并释放高IL-10和TGF- β 。耗竭CCR8+Treg将减少免疫抑制性细胞因子,并调节促肿瘤微环境以恢复抗肿瘤免疫。有趣的是,在患有乳腺癌或胰腺癌的患者中,高CCR8+Treg数与疾病的更晚期相关,并且很可能降低总生存率。因此,CCR8是癌症免疫疗法治疗和潜在治愈CCR8阳性癌症的理想靶点。

发明内容

[0007] 在一个总体方面中,本发明涉及特异性结合趋化因子(C-C基序)受体8(CCR8)的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0008] 提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含重链互补性决定区1(HCDR1)、HCDR2、HCDR3、轻链互补性决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,其具有以下多肽序列:

[0009] (1)分别为SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6;

[0010] (2)分别为SEQ ID NO:13、2、14、4、28和6;

[0011] (3)分别为SEQ ID NO:13、2、15、4、5和6;

[0012] (4)分别为SEQ ID NO:16、17、18、29、30和6;

[0013] (5)分别为SEQ ID NO:19、20、21、4、5和6;

[0014] (6)分别为SEQ ID NO:22、23、24、31、5和32;或者

[0015] (7)分别为SEQ ID NO:25、26、27、33、34和35;

[0016] 其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合趋化因子(C-C基序)受体8(CCR8),优选人CCR8。

[0017] 在某些实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有与SEQ ID NO:7、36、38、40、42、44或46至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的多肽序列,或轻链可变区,其具有与SEQ ID NO:8、37、39、41、43、45或47至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的多肽序列。

[0018] 在某些实施方式中,所述分离的抗CCR8单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

[0019] (1)具有SEQ ID NO:7的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:8的多肽序列的轻链可变区;

[0020] (2)具有SEQ ID NO:36的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:37的多肽序列的轻链可变区;

[0021] (3)具有SEQ ID NO:38的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:39的多肽序列的轻链可变区;

[0022] (4)具有SEQ ID NO:40的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:41的多肽序列的轻链可变区;

[0023] (5)具有SEQ ID NO:42的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:43的多肽序列的轻链可变区;

[0024] (6)具有SEQ ID NO:44的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:45的多肽序列的轻链可变区;或者

[0025] (7)具有SEQ ID NO:46的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:47的多肽序列的轻链可变区。

[0026] 在某些实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段结合至CCR8并且能够通过抗体依赖性细胞毒性(ADCC);抗体依赖性细胞吞噬作用(ADPC)诱导效应物介导的肿瘤细胞裂解;和/或介导缀合药物的活性;和/或与另一种具有肿瘤杀伤作用的单克隆抗体或其抗原结合片段形成双特异性抗体。

[0027] 在某些实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段是嵌合的或者人的或人源化的。

[0028] 在某些实施方式中,所述人源化单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链互补性决定区1(HCDR1)、HCDR2、HCDR3、轻链互补性决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,其具有以下多肽序列:

[0029] (1)分别为SEQ ID NO:1、48、49、50、51和6;

[0030] (2)分别为SEQ ID NO:1、2、49、4、5和6;

[0031] (3)分别为SEQ ID NO:1、2、49、50、51和6;

[0032] (4)分别为SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6;或者

[0033] (5)分别为SEQ ID NO:1、48、49、50、51和6。

[0034] 在某些实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:9、52、53、54、55、56、57、58、59或60至少90%、至少95%、

至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的多肽序列,或轻链可变区,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:10、61、62或63至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的的多肽序列。

[0035] 在某些实施方式中,所述分离的抗CCR8单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

[0036] (1) 具有SEQ ID NO:9的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10的多肽序列的轻链可变区;

[0037] (2) 具有SEQ ID NO:52的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:63的多肽序列的轻链可变区;

[0038] (3) 具有SEQ ID NO:52的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10的多肽序列的轻链可变区;

[0039] (4) 具有SEQ ID NO:53的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10的多肽序列的轻链可变区;

[0040] (5) 具有SEQ ID NO:54的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:63的多肽序列的轻链可变区;或者

[0041] (6) 具有SEQ ID NO:59的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:62的多肽序列的轻链可变区。

[0042] 在某些实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合食蟹猴CCR8。

[0043] 还提供了分离的双特异性抗体或其抗原结合片段,其包含本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0044] 还提供了分离的核酸,其编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段或者双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0045] 还提供了载体,其包含分离的核酸,所述分离的核酸编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段或者双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0046] 还提供了宿主细胞,其包含载体,所述载体包含编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段或者双特异性抗体或其抗原结合片段的分离的核酸。

[0047] 在某些实施方式中,提供了一种药物组合物,其包含本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段或者分离的双特异性抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

[0048] 还提供了在有此需要的受试者的癌细胞表面上特异性靶向C-C基序趋化因子受体8(CCR8)的方法,其包括向所述受试者施用本发明的药物组合物。

[0049] 还提供了在有此需要的受试者中治疗癌症的方法,其包括向所述受试者施用本发明的药物组合物。癌症例如可以是实体瘤,优选具有浸润性T细胞的实体瘤,更优选具有浸润性T_{reg}细胞的实体瘤,更优选具有表达CCR8的高抑制性T_{reg}细胞的实体瘤,最优选具有发生了自然杀伤(NK)细胞浸润的过表达CCR8的浸润性高抑制性T_{reg}细胞的实体瘤。癌症的实例例如可以选自但不限于肺癌、头颈癌、食管癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肝癌、肾癌和黑色素瘤。在某些实施方式中,例如,受试者可以包含表达CCR8的Treg细胞。

[0050] 还提供了生产本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段或者双特异性抗体或其抗原结合片段的方法。所述方法包括在生产单克隆抗体或其抗原结合片段或者双特异性抗体

或其抗原结合片段的条件下培养包含编码所述单克隆抗体或其抗原结合片段或者所述双特异性抗体或其抗原结合片段的核酸的细胞,并且从所述细胞或培养物中回收所述单克隆抗体或其抗原结合片段或者所述双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0051] 还提供了生产药物组合物的方法,所述药物组合物包含本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段或者双特异性抗体或其抗原结合片段。所述方法包括将所述单克隆抗体或其抗原结合片段或者所述双特异性抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体组合以获得所述药物组合物。

[0052] 还提供了确定受试者中的CCR8的水平的方法。所述方法包括(a)从受试者获得样品;(b)将所述样品与本发明的抗CCR8单克隆抗体或其抗原结合片段接触;和(c)确定受试者中CCR8的水平。在某些实施方式中,所述样品是组织样品。例如,组织样品可以是癌症组织样品。在某些实施方式中,样品是血液样品。在某些实施方式中,样品包含Treg细胞。

附图说明

[0053] 当结合附图阅读时,将更好地理解上述发明内容以及本申请的优选实施方式的以下具体实施方式。然而,应当理解,本申请不限于附图中所示的精确实施方式。

[0054] 图1A-1C显示了以亚nM EC_{50} 特异性结合表达CCR8的细胞的抗CCR8单克隆抗体。图1A显示了亲本抗体在CCR8.CHO细胞上的结合。图1B显示了亲本抗体在亲本细胞上的结合。图1C是总结在图1A和图1B中测量的 EC_{50} 的表。

[0055] 图2显示了抗CCR8单克隆抗体识别N-末端表位以及参与蛋白构象的hCCR8环1,并且不识别hCCR4。顶部:嵌合构建体的图(黑色:hCCR8,灰色:hCCR4);底部:与构建体关联的结合性质。

[0056] 图3A-3C显示了与人CCR8蛋白结合并且能够与小鼠和/或食蟹猴CCR8蛋白交叉反应的抗CCR8单克隆抗体。图3A显示了与人、小鼠和食蟹猴CCR8蛋白结合的抗CCR8单克隆抗体。图3B显示了HFB11-21和HFB11-19的 EC_{50} 。图3C显示了HFB11-21和HFB11-2的 EC_{50} 。

[0057] 图4A-4B显示了抗CCR8单克隆抗体的不同CCL1阻断性质(图4A)和相关 IC_{50} 表(图4B)。Cyno交叉反应性抗体不断断hCCL1,相反强hCCR8结合抗体阻断hCCL1

[0058] 图5A-5G显示了抗CCR8单克隆抗体抑制胞内 Ca^{2+} 通量。图5A显示了在存在缓冲液的情况下 Ca^{2+} 的变化。图5B显示了在存在1nM CCL1的情况下 Ca^{2+} 的变化。图5C显示了在存在1nM CCL1+HFB11-3的情况下 Ca^{2+} 的变化。图5D显示了在存在1nM CCL1+HFB11-10的情况下 Ca^{2+} 的变化。图5E显示了在存在缓冲液+10nM CCL1的情况下 Ca^{2+} 的变化。图5F显示了在存在10nM CCL1+HFB11-3的情况下 Ca^{2+} 的变化。图5G显示了在存在10nM CCL1+HFB11-10的情况下 Ca^{2+} 的变化。

[0059] 图6A-6B显示了抗CCR8抗体在ADCC报告子生物测定中有效地与CD16接合并通过CD16工程化细胞介导ADCC。图6A显示了与荧光素酶底物孵育5分钟后的RLU信号。图6B显示了所有抗体的 EC_{50} 和 E_{max} 值的表。

[0060] 图7A-7B显示ADCC增强形式的人源化抗CCR8抗体特异性结合表达CCR8的细胞。图7A显示了MFI信号。图7B显示了所有抗体的 EC_{50} 值的表。

[0061] 图8A-8B显示了人源化抗CCR8抗体阻断CCL1与表达CCR8的细胞结合。图8A显示了CCL1阻断的百分比。图8B显示了所有抗体的 IC_{50} 值的表。

[0062] 图9显示了在ADCC报告子生物测定中人源化HFB11-10Hz37抗CCR8抗体接合CD16 F和V变体两者。

[0063] 图10A-10B显示了人源化抗CCR8抗体在表达CCR8的细胞上介导ADCC。图10A显示了特异性裂解的百分比。图10B显示了所有抗体的 EC_{50} 值的表。

[0064] 图11A-11G显示了抗CCR8 mAb HFB101110的体外表征。图11A显示了如通过流式细胞术所测量的HFB101110与高拷贝(CHOK1-hCCR8, ~30,000个受体/细胞,左图)或低拷贝(M300.19-hCCR8, ~2,000个受体/细胞,右图)细胞的结合。图11B显示了HFB101110针对M300.19-hCCR8细胞的ADCC活性。图11C显示了通过流式细胞术评价的HFB101110与相关趋化因子受体CCR4的结合。图11D显示了用于鉴定由HFB101110识别的CCR8的区域的区域域交换实验。图11E显示了通过流式细胞术测量的HFB101110对hCCL1结合hCCR8的阻断。图11F显示了如通过transwell迁移测定所测量的HFB101110介导的对由重组hCCL1诱导的CCR8+细胞的趋化性的阻断。图11G显示了HFB101110介导的通过向CCR8+细胞添加hCCL1诱导的钙通量的阻断。

[0065] 图12显示了人源化HFB11-10Hz37抗CCR8抗体介导的CCR8+表达细胞的ADCP。

[0066] 图13A-13C显示了人源化抗CCR8抗体在hCCR8-KI小鼠中介导对MC38细胞的抗肿瘤活性。图13A显示了在使用MG053同种型治疗后的肿瘤体积。图13B显示了在使用Hz变体治疗后的肿瘤体积。图13C显示了在使用MG053同种型或Hz变体治疗后的肿瘤体积比较。

[0067] 图14A-14F显示了人源化抗CCR8抗体疗法在体内重新编程肿瘤微环境。图14A显示了在使用同种型或使用HFB11-10Hz37治疗后在CD4+中Treg的百分比。图14B显示了在使用同种型或使用HFB11-10Hz37治疗后在CD4+中CD4+T效应物的百分比。图14C显示了在使用同种型或使用HFB11-10Hz37治疗后在CD3+中CD8+的百分比。图14D显示了在使用同种型或使用HFB11-10Hz37治疗后CD8+/Treg的比率。图14E显示了在使用同种型或使用HFB11-10Hz37治疗后在CD45+中自然杀伤细胞的百分比。图14F显示了在使用同种型或使用HFB11-10Hz37治疗后在Treg中CCR8+的百分比。

[0068] 图15A-15B显示了来自肾细胞癌症(RCC)患者和来自肺癌患者的人原发性肿瘤的T细胞群中CCR8的表达。每个点表示来自个体患者的数据(图15A)。图15B显示了来自RCC患者的TIL的CD8+(CD8+CD3+)、Teff(FoxP3-CD4+CD3+)和Treg(FoxP3+CD4+CD3+)中CCR8表达的直方图。

[0069] 图16显示了在健康和恶性PBMC的来自循环的T细胞群中CCR8的表达。

[0070] 图17A-17E显示了在来自RCC患者(n=13)的原代人TIL上由人源化HFB11-10抗体介导的立体ADCC活性。图17A显示了样品收集和ADCC测定的示意图。图17B显示了不同T细胞亚群的耗竭。每个点代表来自个体患者的数据。图17C显示了在来自代表性RCC患者的TIL中来自同种型组对比使用50nM的HFB11-10Hz抗体治疗组的门控为CD3+CD4+Foxp3+TIGIT+细胞的Treg群。图17D显示了HFB101110的Treg耗竭活性的剂量应答关系。图17E显示了作为外源性NK细胞添加量的函数的ADCC测定中Treg的耗竭。

[0071] 图18A-18C显示了安全性和药代动力学研究。图18A显示了在食蟹猴中单剂量PK研究的示意图。图18B显示了在食蟹猴中HFB101110的血清PK性质。图18C显示了使用可溶性抗体形式使用人PBMC的体外细胞因子释放研究。

具体实施方式

[0072] 背景和说明书通篇引用或描述了各种出版物、文章和专利;这些参考文献中的每一篇通过引用整体并入本文。包括在本说明书中的文献、法案、材料、装置、制品等的讨论是为了提供本发明的背景。这样的讨论并不是承认任何或所有这些内容都构成与所公开或要求保护的发明的现有技术的一部分。

[0073] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。另外,本文所用的某些术语具有说明书中所设定的含义。

[0074] 必须注意的是,如本文和所附权利要求书中所使用的,单数形式“一(a)”,“一个(an)”和“所述(the)”包括复数指代,除非上下文另外清楚地指明。

[0075] 除非另有说明,否则任何数值(例如本文所述的浓度或浓度范围)应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。因此,数值通常包括所述值的 $\pm 10\%$ 。例如,1mg/mL的浓度包括0.9mg/mL至1.1mg/mL。同样地,1%至10%(w/v)的浓度范围包括0.9%(w/v)至11%(w/v)。如本文所用,除非上下文另外清楚地指明,否则数值范围的使用明确包括所有可能的子范围、该范围内的所有单个数值,其包括这些范围内的整数和所述值的分数。

[0076] 除非另有说明,否则一系列要素之前的术语“至少”应理解为指该系列中的每个要素。本领域技术人员将认识到或能够使用不多于常规实验来确定,很多等效于本文所述的本发明的具体实施方式。此类等效物旨在被本发明所涵盖。

[0077] 如本文所用,术语“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“包括(includes)”,“包括(including)”、“具有(has)”、“具有(having)”或“含有(contains)”,或其任何其他变体,将被理解为意味着包含所述整数或整数组,但不排除任何其他整数或整数组,并且是非排他或开放的。例如,包含要素列表的组合物、混合物、过程、方法、制品或装置不一定仅限于那些要素,而是可以包含未明确列出的其他要素,或者未明确列出或固有于这些组合物、混合物,过程、方法,制品或装置的其他要素。此外,除非明确相反,否则“或”是指包含的或,而不是排他性的或。例如,条件A或B由以下任一个满足:A为真(或存在)和B为假(或不),A为假(或不)和B为真(或存在),以及A和B均为真(或存在)。

[0078] 如本文所用,将多个列举的要素之间的连词“和/或”理解为涵盖单独的和组合的选项。例如,当两个要素由“和/或”连接时,第一个选项指的是第一个要素的适用性,而没有第二个要素。第二个选项指的是第二个要素的适用性,而没有第一个要素。第三个选项指第一个和第二个要素一起的适用性。这些选项中的任何一个都被理解为在其含义范围内,因此满足本文所用术语“和/或”的要求。多个选项的同时适用性也被理解为在含义范围内,因此满足术语“和/或”的要求。

[0079] 如本文所用,在整个说明书和权利要求中使用的术语“由...组成(consists of)”或诸如“由...构成(consist of)”或“由...组成(consisting of)”的变体表示包含任何所列举的整数或整数组,但不能向指定的方法、结构或组成中添加额外的整数或整数组。

[0080] 如本文所用,在整个说明书和权利要求中使用的术语“基本由...组成(consists essentially of)”或诸如“基本由...构成(consist essentially of)”或“基本由...构成(consisting essentially of)”的变体表示包含任何所列举的整数或整数组,以及任选地包含任何列举的整数或整数组,其不会实质性地改变指定方法、结构或组成的基本或新颖性质。参见M.P.E.P. §2111.03。

[0081] 如本文所用,“受试者”指任何动物,优选哺乳动物,最优选人。如本文所用,术语“哺乳动物”涵盖任何哺乳动物。哺乳动物的实例包括但不限于奶牛、马、绵羊、猪、猫、狗、小鼠、大鼠、家兔、豚鼠、猴、人等,更优选人。

[0082] 单词“右”、“左”、“下”和“上”表示参考附图中的方向。

[0083] 还应理解,当提及优选发明的部件的尺寸或特征时,此处使用的术语“大约”、“近似”、“一般”、“基本上”和类似术语,指示所描述的尺寸/特征不是严格的边界或参数,并且不排除功能上相同或相似的微小变化,如本领域普通技术人员所理解的。至少,包括数值参数的这种参考将包括使用本领域所接受的数学和工业原理(例如,舍入、测量或其他系统误差、制造公差等)不会改变最低有效数字的变化。

[0084] 术语“相同”或百分比“同一性”,在两个或更多个核酸或多肽序列(例如,抗CCR8抗体和编码其的多核苷酸、CCR8多肽和编码其的CCR8多核苷酸)的上下文中,当使用以下序列比较算法之一或目视检查进行比较和比对以获得最大对应性时,指两个或更多个相同的序列或子序列,或具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸。

[0085] 对于序列比较,通常一个序列充当参考序列,将测试序列与之进行比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法根据指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0086] 用于比较的序列的最佳比对可以例如通过Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 1981; 2:482的局部同源性算法,通过Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 1970; 48:443的同源比对算法;通过Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 1988; 85:2444的相似性搜索法,通过计算机实现这些算法(GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,在Wisconsin遗传学软件包中,Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)或通过目视检查(一般参见,Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel等编著,Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., 1995 Supplement (Ausubel))。

[0087] 适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的实例是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别描述在Altschul等, *J. Mol. Biol.* 1990; 215:403-410和Altschul等, *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:3389-3402中。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心公开获得。该算法首先通过识别查询序列中长度为W的短单词来识别高分序列对(HSP),当与数据库序列中相同长度的单词对齐时,这些单词匹配或满足某个正值阈值评分T。T被称为邻域单词评分阈值(Altschul等,同上)。这些最初的邻域词命中充当起始搜索以找到包含其的较长HSP的种子。然后沿着每个序列在两个方向上扩展单词命中,直到累积比对评分可以增加为止。

[0088] 对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励评分;始终>0)和N(针对不匹配残基的惩罚评分;始终<0)来计算累积评分。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积评分。当出现以下情况时,单词在每个方向上的扩展命中停止:累积比对评分从其最大实现值下降X;由于一个或多个负评分残差比对的累积,累积评分变为零或更低;或者到达任一序列的末尾。BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(针对核苷酸序

列)默认使用字长(W)11、期望值(E)10、 $M=5$ 、 $N=-4$ 以及两条链比较。对于氨基酸序列, BLASTP程序默认使用字长(W)3、期望值(E)10和BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff& Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 89:10915)。

[0089] 除了计算序列同一性百分比以外, BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见,例如, Karlin& Altschul, Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 1993; 90:5873-5787)。BLAST算法提供的一种相似性度量是最小和概率(P(N)), 其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如, 如果测试核酸与参考核酸的比较中的最小总和概率小于约0.1, 更优选小于约0.01, 最优选小于约0.001, 则认为核酸与参考序列相似。

[0090] 两个核酸序列或多肽基本上相同的进一步指示是由第一核酸编码的多肽与由第二核酸编码的多肽具有免疫交叉反应性, 如下所述。因此, 多肽通常与第二多肽基本相同, 例如, 其中两个肽仅通过保守性取代而不同。两个核酸序列基本相同的另一个指示是两个分子在严格条件下相互杂交。

[0091] 如本文所用, 术语“分离的”指一种生物成分(如核酸、肽或蛋白)已与该成分自然存在的生物体的其他生物成分(即, 其他染色体和染色体外DNA和RNA以及蛋白)基本分离、分离或纯化产生。因此, 已经“分离”的核酸、肽和蛋白包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白。“分离的”核酸、肽和蛋白可以是组合物的一部分, 并且如果组合物不是核酸、肽或蛋白质的天然环境的一部分则仍然是分离的。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸、肽和蛋白以及化学合成的核酸。

[0092] 如本文所用, 术语“多核苷酸”, 同义词为“核酸分子”、“核苷酸”或“核酸”, 指任何多核苷酸或聚脱氧核糖核苷酸, 可以是未修饰的RNA或DNA, 也可以是修饰的RNA和DNA。“多核苷酸”包括但不限于单链和双链DNA, 是单链和双链区的混合物的DNA, 单链和双链RNA, 以及是单链和双链区混合物的RNA, 包含DNA和RNA的杂交分子, 其可以是单链, 或者更典型地是双链, 或者是单链和双链区的混合物。此外, “多核苷酸”指包含RNA或DNA或者RNA和DNA两者的三链区。术语多核苷酸还包括含有一个或多个修饰碱基的DNA或RNA, 以及具有出于稳定性或其他原因而修饰的骨架的DNA或RNA。“修饰的”碱基包括, 例如, 三丁基化碱基和不寻常的碱基, 如肌苷。可以对DNA和RNA进行多种修饰; 因此, “多核苷酸”包括自然界中常见的化学、酶促或代谢修饰形式的多核苷酸, 以及病毒和细胞特有的DNA和RNA的化学形式。“多核苷酸”也包括相对较短的核酸链, 通常称为寡核苷酸。

[0093] 如本文所用, 术语“载体”是一种复制子, 其中可以可操作地插入另一个核酸区段, 从而实现该区段的复制或表达。

[0094] 如本文所用, 术语“宿主细胞”指包含本发明的核酸分子的细胞。“宿主细胞”可以是任何类型的细胞, 例如, 原代细胞、培养细胞或来自细胞系的细胞。在一个实施方式中, “宿主细胞”是使用本发明的核酸分子转染的细胞。在另一个实施方式中, “宿主细胞”是这种转染细胞的子代或潜在子代。细胞的子代可能与亲本细胞相同, 也可能不相同, 例如, 由于在子代中可能发生的突变或环境影响, 或核酸分子整合到宿主细胞基因组中。

[0095] 如本文所用, 术语“表达”指基因产物的生物合成。该术语包括将基因转录成RNA。该术语还包括将RNA翻译成一种或多种多肽, 并进一步包括所有天然存在的转录后和翻译后修饰。表达的抗体可以在宿主细胞的细胞质内, 进入细胞外环境如细胞培养物的生长培养基中或锚定在细胞膜上。

[0096] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”或“蛋白”可以指由氨基酸组成的分子,并且可以被本领域技术人员识别为蛋白。本文使用用于氨基酸残基的常规单字母或三字母编码。术语“肽”、“多肽”和“蛋白”可在本文中互换使用,以指代任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是直链或支链的,其可以包含修饰的氨基酸,并且其可以被非氨基酸打断。该术语还包括已经被天然地或通过干预而修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化,或任何其他操作或修饰,如与标记组分缀合。定义中还包括,例如,含有一种或多种氨基酸类似物(包括,例如,非天然氨基酸等)的多肽,以及本领域公知的其他修饰。

[0097] 本文所述的肽序列是根据通常的惯例编写的,其中肽的N末端区在左边,C末端区在右边。尽管氨基酸的异构形式是已知的,但除非另有明确指示,否则所代表的是氨基酸的L-形式。

[0098] 抗体

[0099] 本发明一般涉及分离的趋化因子(C-C基序)受体8抗体,编码所述抗体的核酸和表达载体,包含所述载体的重组细胞,表达所述抗体的重组细胞以及包含所述抗体的组合物。还公开了制备所述抗体的方法,以及使用所述抗体治疗疾病(如癌症)的方法。本发明的抗体具有一种或多种所需功能性质,包括但不限于与CCR8的高亲和力结合,对CCR8的高特异性,针对表达CCR8的细胞刺激抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的能力以及当单独或与其他抗癌疗法联合施用时在受试者和动物模型中抑制肿瘤生长的能力。

[0100] 在一般的方面中,本发明涉及结合趋化因子(C-C基序)受体8(CCR8)的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0101] 如本文所用,术语“抗体”在广义上使用,包括免疫球蛋白或抗体分子,包括人、人源化、复合和嵌合抗体以及单克隆或多克隆抗体片段。在通常情况下,抗体是对特定抗原表现出结合特异性的蛋白或肽链。抗体结构是众所周知的。根据重链恒定结构域氨基酸序列,免疫球蛋白可分为五大类(即,IgA、IgD、IgE、IgG和IgM)。IgA和IgG进一步细分为同种型IgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。因此,本发明的抗体可以是五大类或相应亚类中的任何一种。优选地,本发明的抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。脊椎动物的抗体轻链可以根据其恒定结构域的氨基酸序列分为两种明显不同的类型之一,即 κ 和 λ 。因此,本发明的抗体可以含有 κ 或 λ 轻链恒定结构域。根据特定实施方式,本发明的抗体包含来自大鼠或人抗体的重链和/或轻链恒定区。除了重链恒定结构域和轻链恒定结构域之外,抗体还包含抗原结合区,该抗原结合区由轻链可变区和重链可变区组成,每一个都包含三个结构域(即,互补性决定区1-3;CDR1、CDR2和CDR3)。轻链可变区结构域可替换地称为LCDR1、LCDR2和LCDR3,而重链可变区结构域可替代地称为HCDR1、HCDR2和HCDR3。

[0102] 如本文所用,术语“分离的抗体”指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性结合CCR8的分离的抗体基本上不含不结合CCR8的抗体)。此外,分离的抗体基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0103] 如本文所用,术语“单克隆抗体”指从基本上同质的抗体群中获得的抗体,即,组成该群的单个抗体是相同的,除了可能存在少量的天然存在的突变以外。本发明的单克隆抗体可以通过杂交瘤方法、噬菌体展示技术、单淋巴细胞基因克隆技术或通过重组DNA方法制备。例如,单克隆抗体可以由杂交瘤产生,所述杂交瘤包括从转基因非人动物(如转基因小

鼠或大鼠)获得的B细胞,所述转基因非人动物具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0104] 如本文所用,术语“抗原结合片段”指抗体片段,比如,例如,双体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、二硫化物稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫化物稳定的双体(ds双体)、单链抗体分子(scFv)、单域抗体(sdab)、scFv二聚体(二价双体)、由包含一个或多个CDR的抗体的一部分形成的多特异性抗体、骆驼化单域抗体、纳米抗体、结构域抗体、二价结构域抗体或与抗原结合但不包含完整抗体结构的任何其他抗体片段。抗原结合片段能够与亲本抗体或亲本抗体片段结合的同抗原结合。根据特定实施方式,抗原结合片段包含轻链可变区、轻链恒定区和重链的Fd区段。根据其他特定实施方式,抗原结合片段包含Fab和F(ab')。

[0105] 如本文所用,术语“单链抗体”指本领域中的常规单链抗体,其包含由约15至约20个氨基酸的短肽连接的重链可变区和轻链可变区。如本文所用,术语“单域抗体”指本领域中的常规单域抗体,其包含重链可变区和重链恒定区,或者仅包括重链可变区。

[0106] 如本文所用,术语“人抗体”指由人产生的抗体或具有与使用本领域已知的任何技术制备的由人产生抗体相对应的氨基酸序列的抗体。人抗体的该定义包括完整或全长抗体、其片段和/或包含至少一个人重链和/或轻链多肽的抗体。

[0107] 如本文所用,术语“人源化抗体”和/或“人源化抗原结合结构域”指经过修饰以增加与人抗体的序列同源性,从而保留抗体的抗原结合性质,但其在人体内的抗原性降低的非人抗体。

[0108] 如本文所用,术语“嵌合抗体”指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列来源于两个或更多个物种的抗体。轻链和重链的可变区通常对应于来源于具有所需特异性、亲和力和能力的一个哺乳动物物种(例如,小鼠、大鼠、家兔等)的抗体的可变区,而恒定区对应于来源于另一个哺乳动物物种(例如,人)的抗体序列,以避免在该物种中引发免疫反应。

[0109] 如本文所用,术语“多特异性抗体”指包含多个免疫球蛋白可变结构域序列的抗体,其中所述多个的第一免疫球蛋白可变结构域序列具有对第一表位的结合特异性,并且所述多个的第二免疫球蛋白可变结构域序列具有对第二表位的结合特异性。在一个实施方式中,第一和第二表位在相同抗原上,例如,相同蛋白(或多聚体蛋白的亚基)。在一个实施方式中,第一和第二表位重叠或基本重叠。在一个实施方式中,第一和第二表位不重叠或基本不重叠。在一个实施方式中,第一和第二表位是不同抗原,例如,不同蛋白(或多聚体蛋白的不同亚基)。在一个实施方式中,多特异性抗体包含第三、第四或第五免疫球蛋白可变结构域。在一个实施方式中,多特异性抗体是双特异性抗体分子、三特异性抗体分子或四特异性抗体分子。

[0110] 如本文所用,术语“双特异性抗体”指结合不超过两个表位或两个抗原的多特异性抗体。双特异性抗体的特征在于对第一表位具有结合特异性的第一免疫球蛋白可变结构域序列和对第二表位具有结合特异性的第二免疫球蛋白可变结构域序列。在一个实施方式中,第一和第二表位在相同抗原上,例如,相同蛋白(或多聚体蛋白的亚基)。在一个实施方式中,第一和第二表位重叠或基本重叠。在一个实施方式中,第一和第二表位在不同抗原上,例如,不同蛋白(或多聚体蛋白的不同亚基)。在一个实施方式中,双特异性抗体包含对第一表位具有结合特异性的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列,以及对第二表位

具有结合特异性的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列。在一个实施方式中,双特异性抗体包含对第一表位具有结合特异性的半抗体或其片段,以及对第二表位具有结合特异性的半抗体或其片段。在一个实施方式中,双特异性抗体包含对第一表位具有结合特异性的scFv或其片段,以及对第二表位具有结合特异性的scFv或其片段。在一个实施方式中,第一表位位于CCR8上和第二表位位于PD-1、PD-L1、CTLA-4、EGFR、HER-2、CD19、CD20、CD33、CD3和/或其他肿瘤相关免疫抑制物或表面抗原上。

[0111] 如本文所用,“特异性结合CCR8”的抗体指以 1×10^{-7} M或更低的KD,优选 1×10^{-8} M或更低,更优选 5×10^{-9} M或更低、 1×10^{-9} M或更低、 5×10^{-10} M或更低或者 1×10^{-10} M或更低结合至CCR8,优选人CCR8,的抗体和/或抗原结合结构域。在某些实施方式中,抗体和/或抗原结合结构域结合至食蟹猴CCR8。术语“KD”指离解常数,该常数由Kd与Ka的比值(即,Kd/Ka)获得,并表示为摩尔浓度(M)。鉴于本公开内容,可以使用本领域的方法确定抗体的KD值。例如,抗体的KD可以通过使用表面等离子体共振来确定,如通过使用生物传感器系统,例如,Biacore®系统,或者通过使用生物层干涉测量技术,如Octet RED96系统。

[0112] 抗体的KD值越小,抗体与靶抗原结合的亲和力就越高。

[0113] 如本文所用,术语“IC₅₀”指本发明的单克隆或双特异性抗体或其抗原结合片段的半数最大抑制浓度。IC₅₀是本发明的单克隆或双特异性抗体或其抗原结合片段在细胞中抑制CCL1与CCR8的结合或抑制CCR8功能的效力的指标。在某些实施方式中,单克隆抗体或其抗原结合片段或者双特异性抗体或其抗原结合片段具有小于约 10^{-7} M、小于约 10^{-8} M、小于约 10^{-9} M、小于约 10^{-10} M、小于约 10^{-11} M、小于约 10^{-12} M或小于约 10^{-13} M的KD。

[0114] 如本文所用,术语“EC₅₀”指本发明的单克隆或双特异性抗体或其抗原结合片段的半最大有效浓度。EC₅₀指单克隆或双特异性抗体或其抗原结合片段的浓度,用于在指定的暴露时间内在基线和最大值之间的一半诱导生物应答(即,细胞死亡)。在某些实施方式中,单克隆抗体或其抗原结合片段或者双特异性抗体或其抗原结合片段具有小于约 $1 \mu\text{M}$ 、约 1000nM 至约 100nM 、约 100nM 至约 10nM 、约 10nM 至约 1nM 、约 1000pM 至约 500pM 、约 500pM 至约 200pM 、小于约 200pM 、约 200pM 至约 150pM 、约 200pM 至约 100pM 、约 100pM 至约 10pM 或约 10pM 至约 1pM 的EC₅₀。

[0115] 根据特定方面,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段或抗原结合结构域包含重链互补性决定区1(HCDR1)、HCDR2、HCDR3、轻链互补性决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,其具有以下多肽序列:

[0116] (1)分别为SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6;

[0117] (2)分别为SEQ ID NO:13、2、14、4、28和6;

[0118] (3)分别为SEQ ID NO:13、2、15、4、5和6;

[0119] (4)分别为SEQ ID NO:16、17、18、29、30和6;

[0120] (5)分别为SEQ ID NO:19、20、21、4、5和6;

[0121] (6)分别为SEQ ID NO:22、23、24、31、5和32;或者

[0122] (7)分别为SEQ ID NO:25、26、27、33、34和35;

[0123] 其中所述抗体或其抗原结合片段或其抗原结合结构域特异性结合趋化因子(C-C基序)受体8(CCR8),优选人CCR8。

[0124] 根据另一个特定方面,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其

中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有与SEQ ID NO:7、36、38、40、42、44或46至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,或轻链可变区,其具有与SEQ ID NO:8、37、39、41、43、45或47至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列。根据一个优选的实施方式,本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有与SEQ ID NO:7至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,和轻链可变区,其具有与SEQ ID NO:8至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列。

[0125] 根据特定实施方式,所述分离的抗CCR8单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

[0126] (1) 具有SEQ ID NO:7的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:8的多肽序列的轻链可变区;

[0127] (2) 具有SEQ ID NO:36的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:37的多肽序列的轻链可变区;

[0128] (3) 具有SEQ ID NO:38的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:39的多肽序列的轻链可变区;

[0129] (4) 具有SEQ ID NO:40的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:41的多肽序列的轻链可变区;

[0130] (5) 具有SEQ ID NO:42的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:43的多肽序列的轻链可变区;

[0131] (6) 具有SEQ ID NO:44的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:45的多肽序列的轻链可变区;或者

[0132] (7) 具有SEQ ID NO:46的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:47的多肽序列的轻链可变区。

[0133] 在一个实施方式中,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其分别具有SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6的多肽序列。在另一个实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有与SEQ ID NO:7至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,和轻链可变区,其具有与SEQ ID NO:8至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列。优选地,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有SEQ ID NO:7的多肽序列;和轻链可变区,其具有SEQ ID NO:8的多肽序列。

[0134] 在一个实施方式中,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其分别具有SEQ ID NO:13、2、14、4、28和6的多肽序列。在另一个实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有与SEQ ID NO:36至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,和轻链可变区,其具有与SEQ ID NO:37至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列。优选地,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有SEQ ID NO:36的多肽序列;和轻链可变区,其具有SEQ ID NO:37的多肽序列。

[0135] 在一个实施方式中,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其分别具有SEQ ID NO:13、2、15、4、5和6的多肽序列。在另一个实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有与SEQ ID NO:38至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,和轻链可变区,其具有与SEQ ID NO:39至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列。优选地,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有SEQ ID NO:38的多肽序列;和轻链可变区,其具有SEQ ID NO:39的多肽序列。

[0136] 在一个实施方式中,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其分别具有SEQ ID NO:16、17、18、29、30和6的多肽序列。在另一个实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有与SEQ ID NO:40至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,和轻链可变区,其具有与SEQ ID NO:41至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列。优选地,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有SEQ ID NO:40的多肽序列;和轻链可变区,其具有SEQ ID NO:41的多肽序列。

[0137] 在一个实施方式中,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其分别具有SEQ ID NO:19、20、21、4、5和6的多肽序列。在另一个实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有与SEQ ID NO:42至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,和轻链可变区,其具有与SEQ ID NO:43至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列。优选地,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有SEQ ID NO:42的多肽序列;和轻链可变区,其具有SEQ ID NO:43的多肽序列。

[0138] 在一个实施方式中,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其分别具有SEQ ID NO:22、23、24、31、5和32的多肽序列。在另一个实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有与SEQ ID NO:44至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,和轻链可变区,其具有与SEQ ID NO:45至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列。优选地,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有SEQ ID NO:44的多肽序列;和轻链可变区,其具有SEQ ID NO:45的多肽序列。

[0139] 在一个实施方式中,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其分别具有SEQ ID NO:25、26、27、33、34和35的多肽序列。在另一个实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有与SEQ ID NO:46至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,和轻链可变区,其具有与SEQ ID NO:47至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列。优选地,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有SEQ ID NO:46的多肽序

列;和轻链可变区,其具有SEQ ID NO:47的多肽序列。

[0140] 根据另一个特定方面,本发明涉及本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段或者双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆或双特异性抗体或其抗原结合片段是嵌合的。

[0141] 根据另一个特定方面,本发明涉及本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段或者双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆或双特异性抗体或其抗原结合片段是人的或人源化的。

[0142] 根据另一个特定方面,本发明涉及一种人源化单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含重链互补性决定区1(HCDR1)、HCDR2、HCDR3、轻链互补性决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,其具有以下多肽序列:

[0143] (1)分别为SEQ ID NO:1、48、49、50、51和6;

[0144] (2)分别为SEQ ID NO:1、2、49、4、5和6;

[0145] (3)分别为SEQ ID NO:1、2、49、50、51和6;

[0146] (4)分别为SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6;或者

[0147] (5)分别为SEQ ID NO:1、48、49、50、51和6。

[0148] 根据另一个特定方面,本发明涉及一种人源化单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:9、52、53、54、55、56、57、58、59或60至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的多肽序列,或轻链可变区,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:10、61、62或63至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的多肽序列。

[0149] 根据另一个特定方面,所述人源化抗CCR8单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

[0150] (1)具有SEQ ID NO:9的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10的多肽序列的轻链可变区;

[0151] (2)具有SEQ ID NO:52的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:63的多肽序列的轻链可变区;

[0152] (3)具有SEQ ID NO:52的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10的多肽序列的轻链可变区;

[0153] (4)具有SEQ ID NO:53的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10的多肽序列的轻链可变区;

[0154] (5)具有SEQ ID NO:54的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:63的多肽序列的轻链可变区;或者

[0155] (6)具有SEQ ID NO:59的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:62的多肽序列的轻链可变区。

[0156] 在一个实施方式中,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其分别具有SEQ ID NO:1、48、49、50、51和6的多肽序列。在另一个实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:9至少85%、优选90%、更优选95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,或轻链可变区,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:10至少至少85%、优选90%、更优选95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的

多肽序列。优选地,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有SEQ ID NO:9的多肽序列,和轻链可变区,其具有SEQ ID NO:10的多肽序列。

[0157] 在一个实施方式中,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其分别具有SEQ ID NO:1、2、49、4、5和6的多肽序列。在另一个实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:52至少85%、优选90%、更优选95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,或轻链可变区,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:63至少至少85%、优选90%、更优选95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列。优选地,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有SEQ ID NO:52的多肽序列,和轻链可变区,其具有SEQ ID NO:63的多肽序列。

[0158] 在一个实施方式中,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其分别具有SEQ ID NO:1、2、49、50、51和6的多肽序列。在另一个实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:52至少85%、优选90%、更优选95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,或轻链可变区,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:10至少至少85%、优选90%、更优选95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列。优选地,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有SEQ ID NO:52的多肽序列,和轻链可变区,其具有SEQ ID NO:10的多肽序列。

[0159] 在一个实施方式中,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其分别具有SEQ ID NO:1、2、49、50、51和6的多肽序列。在另一个实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:53至少85%、优选90%、更优选95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,或轻链可变区,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:10至少至少85%、优选90%、更优选95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列。优选地,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有SEQ ID NO:53的多肽序列,和轻链可变区,其具有SEQ ID NO:10的多肽序列。

[0160] 在一个实施方式中,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其分别具有SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6的多肽序列。在另一个实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:54至少85%、优选90%、更优选95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,或轻链可变区,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:63至少至少85%、优选90%、更优选95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列。优选地,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有SEQ ID NO:54的多肽序列,和轻链可变区,其具有SEQ ID NO:63的多肽序列。

[0161] 在一个实施方式中,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其分别具有SEQ ID NO:1、48、49、50、51和6的多肽序列。在另一个实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:59至少85%、优选90%、更优选95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列,或轻链可变区,所述轻链可变区具有与SEQ ID

N0:62至少至少85%、优选90%、更优选95%或更高,如95%、96%、97%、98%或99%相同的多肽序列。优选地,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其具有SEQ ID N0:59的多肽序列,和轻链可变区,其具有SEQ ID N0:62的多肽序列。

[0162] 在另一个一般方面中,本发明涉及一种分离的核酸,其编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段和/或双特异性抗体或其抗原结合片段。本领域技术人员将理解的是,蛋白的编码序列可以在不改变蛋白的氨基酸序列的情况下改变(例如,替换、缺失、插入等)。因此,本领域技术人员将理解,编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段的核酸序列可以在不改变蛋白的氨基酸序列的情况下被改变。

[0163] 在另一个一般方面中,本发明涉及一种载体,其包含编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段和/或双特异性抗体或其抗原结合片段的分离的核酸。根据本公开内容,本领域技术人员公知的任何载体都可以使用,如质粒、粘粒、噬菌体载体或病毒载体。在一些实施方式中,载体是重组表达载体,如质粒。载体可以包含建立表达载体的常规功能的任何元件,例如启动子、核糖体结合元件、终止子、增强子、选择标记和复制原点。启动子可以是组成型、诱导型或抑制型启动子。很多能够将核酸递送到细胞的表达载体是本领域公知的,并且可以在本文中用于在细胞中产生抗体或其抗原结合片段。常规的克隆技术或人工基因合成可用于产生根据本发明实施方式的重组表达载体。

[0164] 在另一个一般方面中,本发明涉及一种宿主细胞,其包含编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段和/或双特异性抗体或其抗原结合片段的分离的核酸。针对本公开内容,本领域技术人员公知的任何宿主细胞都可用于重组表达本发明的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,宿主细胞是E.coli TG1或BL21细胞(用于表达例如scFv或Fab抗体)、CHO-DG44或CHO-K1细胞或HEK293细胞(用于表达例如全长IgG抗体)。根据特定实施方式,通过常规方法如化学转染、热休克或电穿孔将重组表达载体转化到宿主细胞中,其中其稳定地整合到宿主细胞基因组中,从而有效表达重组核酸。

[0165] 在另一个一般方面中,本发明涉及一种生产本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段和/或双特异性抗体或其抗原结合片段的方法,其包括在生产本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其抗原结合片段的条件下培养包含编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其抗原结合片段的核酸的细胞,并且从细胞或细胞培养物(例如,从上清液)回收单克隆和/或双特异性抗体或其抗原结合片段。表达的单克隆和/或双特异性抗体或其抗原结合片段可以从细胞中收获,并根据本领域公知的和本文所述的常规技术进行纯化。

[0166] 药物组合物

[0167] 在另一个一般方面中,本发明涉及一种药物组合物,其包含本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体或其抗原结合片段、分离的多核苷酸和/或分离的多肽,以及药学上可接受的载体。

[0168] 如本文所用,术语“药物组合物”指包含本发明的分离的多核苷酸,本发明的分离的多肽,本发明的抗CCR8单克隆抗体或其抗原结合片段和/或双特异性抗体以及药学上可接受的载体的产品。本发明的多核苷酸、多肽、抗CCR8单克隆抗体或其抗原结合片段和/或双特异性抗体以及包含其的组合物还用于制备用于上文所述的治疗性应用的药物中。

[0169] 如本文所用,术语“载体”指任何赋形剂、稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶

剂、油、脂质、含脂质囊泡、微球、脂质体包封或本领域熟知的用于药物制剂的其他材料。应当理解,载体、赋形剂或稀释剂的特征将取决于特定应用的施用途径。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”是指不干扰本发明组合物的有效性或本发明组合物生物活性的无毒材料。根据特定实施方式,针对本公开内容,任何适用于抗体药物组合物的药学上可接受的载体都可用于本发明。

[0170] 药学活性成分与药学上可接受的载体的制剂是本领域公知的,例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy (例如,第21版(2005)以及任何后续版本)。附加成分的非限制性实例包括缓冲剂、稀释剂、溶剂、等张力剂、防腐剂、稳定剂和螯合剂。可以将一种或多种药学上可接受的载体用于本发明药物组合物的制剂中。

[0171] 在本发明的一个实施方式中,药物组合物是液体制剂。液体制剂的优选实例是水性制剂,即,包含水的制剂。液体制剂可以包括溶液、混悬液、乳剂、微乳、凝胶等。水性制剂通常包含至少50%w/w水,或者至少60%、70%、75%、80%、85%、90%或至少95%w/w水。

[0172] 在一个实施方式中,药物组合物可以配制成可注射的,其可以例如通过注射装置(例如,注射器或输注泵)注射。例如,注射可以通过皮下、肌肉、腹腔内、玻璃体内或静脉内递送。

[0173] 在另一个实施方式中,药物组合物是固体制剂,例如,冷冻干燥或喷雾干燥的组合物,其可以按原样使用,或者医生或患者在使用前向其添加溶剂和/或稀释剂。固体剂型可以包括片剂,如压缩片剂和/或包衣片剂,以及胶囊(例如,硬明胶或软明胶胶囊)。例如,药物组合物也可以是小袋、薄片、粉剂、颗粒、锭剂或用于重构的粉剂的形式。

[0174] 剂型可以是立即释放的,在这种情况下其可以包括水溶性或分散性载体,或者其可以是延迟释放、持续释放或改性释放,在这种情况下其可以包含调节剂型在胃肠道或皮肤下的溶出速率的水不溶性聚合物。

[0175] 在其他实施方式中,药物组合物可以鼻内、口腔内或舌下递送。

[0176] 在水性制剂中的pH可以在pH 3和pH 10之间。在本发明的一个实施方式中,制剂的pH是从约7.0至约9.5。在本发明的另一个实施方式中,制剂的pH是从约3.0至约7.0。

[0177] 在本发明的另一个实施方式中,药物组合物包含缓冲剂。缓冲剂的非限制性实例包括:精氨酸、天冬氨酸、bicine (N,N-二羟乙基甘氨酸)、柠檬酸、磷酸氢二钠、富马酸、甘氨酸、甘氨酸甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、马来酸、苹果酸、乙酸钠、碳酸钠、磷酸二氢钠、磷酸钠、琥珀酸、酒石酸、tricine (三羟甲基甲基甘氨酸) 和三(羟甲基)-氨基甲烷及其混合物。缓冲剂可以单独存在或在聚集体中,浓度从约0.01mg/ml至约50mg/ml,例如从约0.1mg/ml至约20mg/ml。包含这些特定缓冲剂中的每一种的药物组合物构成本发明的替代实施方式。

[0178] 在本发明的另一个实施方式中,药物组合物包含防腐剂。防腐剂的非限制性实例包括:苜蓿氯铵、苯甲酸、苜蓿醇、溴硝丙二醇、4-羟基苯甲酸丁酯、氯丁醇、氯甲酚、氯己啶、氯苯甘醚、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、4-羟基苯甲酸乙酯、伊咪脲、4-羟基苯甲酸甲酯、苯酚、2-苯氧基乙醇、2-苯乙醇、4-羟基苯甲酸丙酯、脱氢醋酸钠、硫柳汞及其混合物。防腐剂可以单独存在或在聚集体中,浓度从约0.01mg/ml至约50mg/ml,例如从约0.1mg/ml至约20mg/ml。包含这些特定防腐剂中的每一种的药物组合物构成本发明的替代实施方式。

[0179] 在本发明的另一个实施方式中,药物组合物包含等张剂。等张剂的非限制性实例包括盐(如氯化钠)、氨基酸(如甘氨酸、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨

酸和苏氨酸)、醛糖醇(如甘油、1,2-丙二醇丙二醇、1,2-丙二醇和1,3-丁二醇)、聚乙二醇(例如,PEG400)及其混合物。等张剂的另一个实例包括糖。糖的非限制性实例可以是单糖、二糖或多糖,或水溶性葡聚糖,包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、右旋糖酐、普鲁兰、糊精、环糊精、 α 和 β HPCD、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素钠。等张剂的另一个实例是糖醇,其中术语“糖醇”定义为具有至少一个-OH基团的C(4-8)烃。糖醇的非限制性实例包括甘露醇、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇和阿拉伯糖醇。等张剂可以单独存在或在聚集体中,浓度从约0.01mg/ml至约50mg/ml,例如从约0.1mg/ml至约20mg/ml。包含这些特定等张剂中的每一种的药物组合物构成本发明的替代实施方式。

[0180] 在本发明的另一个实施方式中,药物组合物包含螯合剂。螯合剂的非限制性实例包括柠檬酸、天冬氨酸、乙二胺四乙酸(EDTA)的盐及其混合物。螯合剂可以单独存在或在聚集体中,浓度从约0.01mg/ml至约50mg/ml,例如从约0.1mg/ml至约20mg/ml。包含这些特定螯合剂中的每一种的药物组合物构成本发明的替代实施方式。

[0181] 在本发明的另一个实施方式中,药物组合物包含稳定剂。稳定剂的非限制性实例包括一种或多种聚集抑制剂、一种或多种氧化抑制剂、一种或多种表面活性剂和/或一种或多种蛋白酶抑制剂。

[0182] 在本发明的另一个实施方式中,药物组合物包含稳定剂,其中所述稳定剂是羧基/羟基纤维素及其衍生物(如HPC、HPC-SL、HPC-L和HPMC)、环糊精、2-甲基硫乙醇、聚乙二醇(如PEG 3350)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、盐(如氯化钠)、含硫物质,如一硫代甘油)或巯基乙酸。稳定剂可以单独存在或在聚集体中,浓度从约0.01mg/ml至约50mg/ml,例如从约0.1mg/ml至约20mg/ml。包含这些特定稳定剂中的每一种的药物组合物构成本发明的替代实施方式。

[0183] 在本发明的进一步的实施方式中,药物组合物包含一种或多种表面活性剂,优选一种表面活性剂、至少一种表面活性剂或者两者不同表面活性剂。术语“表面活性剂”是指由水溶性(亲水性)部分和脂溶性(亲脂性)部分组成的任何分子或离子。表面活性剂例如可以选自阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、非离子表面活性剂和/或两性离子表面活性剂。表面活性剂可以单独存在或在聚集体中,浓度从约0.01mg/ml至约20mg/ml。包含这些特定表面活性剂中的每一种的药物组合物构成本发明的替代实施方式。

[0184] 在本发明的一个进一步的实施方式中,药物组合物包含一种或多种蛋白酶抑制剂,比如,例如,EDTA和/或盐酸苯甲脒(HCl)。蛋白酶抑制剂可以单独存在或在聚集体中,浓度从约0.01mg/ml至约20mg/ml。包含这些特定蛋白酶抑制剂中的每一种的药物组合物构成本发明的替代实施方式。

[0185] 在另一个一般方面中,本发明涉及一种生产药物组合物的方法,所述药物组合物包含本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段和/或双特异性抗体或其抗原结合片段,其包括将单克隆抗体或其抗原结合片段和/或双特异性抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体组合,以获得药物组合物。

[0186] 使用方法

[0187] 在另一个一般方面中,本发明涉及一种在有此需要的受试者中治疗癌症的方法,其包括向受试者施用包含本发明的抗CCR8单克隆和/或双特异性抗体或其抗原结合片段的

药物组合物。例如,癌症可以选自但不限于肺癌、头颈癌、食管癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、肾癌和黑色素瘤。

[0188] 在一些方面中,本发明涉及一种在有此需要的受试者中诱导肿瘤浸润调节性T细胞(TITC)耗竭的方法,其包括向受试者施用包含本发明的抗CCR8单克隆和/或双特异性抗体或其抗原结合片段的药物组合物。在各个方面中,包括CD4+T细胞和CD8+T细胞在内的其他T细胞不受诱导的细胞耗竭的影响。在其他方面中,所述方法进一步诱导肿瘤微环境的重新编程。在各个方面中,诱导TITC耗竭包括诱导自然杀伤(NK)介导的表达CCR-8的癌细胞的杀伤。在其他方面中,诱导NK介导的杀伤包括抑制TITC诱导的免疫抑制。

[0189] 在另一个一般方面中,本发明涉及一种在受试者的癌细胞表面上靶向CCR8以实现细胞杀伤的方法,所述方法包括向受试者施用特异性结合CCR8的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段和/或双特异性抗体或其抗原结合片段或者包含本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段和/或双特异性抗体或其抗原结合片段的药物组合物。抗CCR8单克隆或双特异性抗体或抗原结合片段与CCR8的结合可介导抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或导致靶向癌细胞死亡的其他效应。单克隆或双特异性抗体或其抗原结合片段可以例如用于募集缀合的药物,和/或可以与另一单克隆抗体形成双特异性抗体以介导靶向癌细胞的死亡。

[0190] 结合CCR8的抗体及其抗原结合片段的功能活性可以通过本领域公知的和本文所述的方法来表征。用于表征结合CCR8的抗体及其抗原结合片段的方法包括但不限于亲和力和特异性测定,包括Biacore、ELISA和OctetRed分析,以及通过FACS在细胞上(使用CCR8转染的细胞或者天然表达CCR8的细胞)检测抗体和抗原结合片段与CCR8的结合。根据特定实施方式,用于表征结合CCR的抗体及其抗原结合片段的方法包括下文所述的那些。

[0191] 在另一个一般方面中,本发明涉及一种在有此需要的受试者中治疗癌症的方法,其包括向受试者施用特异性结合CCR8的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段和/或双特异性抗体或其抗原结合片段或者本发明的药物组合物。例如,癌症可以是实体瘤,优选具有浸润性T细胞的实体瘤,更优选具有浸润性T reg细胞的实体瘤,更优选具有表达CCR8的高抑制性T reg细胞的实体瘤,最优选具有发生了自然杀伤(NK)细胞浸润的过表达CCR8的浸润性高抑制性T reg细胞的实体瘤。例如,癌症可以选自但不限于肺癌、头颈癌、食管癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肝癌、肾癌和黑色素瘤。根据特定实施方式,例如,受试者可以包含表达CCR8的Treg。

[0192] 如本文中针对抗CCR8抗体或其抗原结合片段所使用的,治疗有效量是指调节有此需要的受试者的免疫应答的抗CCR8抗体或其抗体结合片段的量。此外,如本文中针对抗CCR8抗体或其抗原结合片段所使用的,治疗有效量指导致治疗疾病、病症或病况;预防或减缓疾病、病症或病况的进展;或减少或完全缓解与疾病、病症或病况相关的症状的抗CCR8抗体或其抗原结合片段的量。

[0193] 根据特定实施方式,待治疗的疾病、病症或病况是癌症。例如,癌症可以是实体瘤,优选具有浸润性T细胞的实体瘤,更优选具有浸润性T reg细胞的实体瘤,更优选具有表达CCR8的高抑制性T reg细胞的实体瘤,最优选具有发生了自然杀伤(NK)细胞浸润的过表达CCR8的浸润性高抑制性T reg细胞的实体瘤。例如,癌症可以选自但不限于肺癌、头颈癌、食管癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肝癌、肾癌和黑色素瘤。

[0194] 根据特定实施方式,治疗有效量指足以达到以下一种、两种、三种、四种或更多种效果的治疗量:(i)减轻或改善待治疗疾病、病症或病况或与其相关症状的严重程度;(ii)缩短待治疗疾病、病症或病况或与其相关症状的持续时间;(iii)预防待治疗疾病、病症或病况或与其相关症状的进展;(iv)导致待治疗疾病、病症或病况或与其相关症状的消退;(v)预防待治疗疾病、病症或病况或与其相关症状的发展或起始;(vi)预防待治疗疾病、病症或病况或与其相关症状的复发;(vii)减少患有待治疗疾病、病症或病况或与其相关症状的受试者的住院治疗;(viii)缩短患有待治疗疾病、病症或病况或与其相关症状的受试者的住院时间;(ix)增加患有待治疗疾病、病症或病况或与其相关症状的受试者的存活;(xi)抑制或减少受试者中待治疗的疾病、病症或病况或与其相关的症状;和/或(xii)增强或改善另一种疗法的预防或治疗作用。

[0195] 可以根据各种因素改变治疗有效量或剂量,如待治疗的疾病、病症或病况、施用方式、靶位点、受试者的生理状态(包括例如年龄、体重、健康)、受试者是人还是动物、所施用的其他药物以及治疗是预防性的还是治疗性的。对治疗剂量进行最佳滴定,以优化安全性和有效性。

[0196] 根据特定实施方式,将本文所述的组合物配制成适于向受试者施用的预期途径。例如,本文所述的组合物可以配制成适合于静脉内、皮下或肌肉内施用。

[0197] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”都是指与癌症相关的至少一个可测量的物理参数的改善或逆转,这些物理参数在受试者中不是必需可辨别的,但在受试者中是可辨别的。术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”也可以指引起消退、阻止进展或至少减缓疾病、病症或病况的进展。在一个特定实施方式中,“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”指减轻、预防与疾病、病症或病况(如肿瘤或更优选癌症)相关的一种或多种症状的发展或起始,或缩短其持续时间。在一个特定实施方式中,“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”指预防疾病、病症或病况的复发。在一个特定实施方式中,“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”指增加患有疾病、病症或病况的受试者的存活。在一个特定实施方式中,“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”指在受试者中消除疾病、病症或病况。

[0198] 根据特定实施方式,提供了用于治疗癌症的组合物。对于癌症疗法,提供的组合物可以用于与其他治疗联用,包括但不限于化学疗法、抗CD20 mAb、抗EGFR mAb、抗HER-2mAb、抗CD19 mAb、抗CD33 mAb、抗CD47 mAb、抗CD73 mAb、抗PD-1mAb、抗PD-L1mAb、抗CTLA mAb、抗TNFR2 mAb、抗OX40 mAb、其他免疫肿瘤学药物、抗血管生成剂、放射疗法、抗体-药物缀合物(ADC)、靶向疗法、其他抗癌药和/或靶向免疫调节靶点的治疗,包括但不限于PD1和PD-L1。可以将针对CCR8的抗体用于与针对PD-1、PD-L1、CTLA-4、CTLA、TNFR2、OX40、EGFR、HER-2、CD19、CD20、CD33、CD73、CD47和/或CD3的伴侣mAb构建双特异性抗体。识别CCR8上两个不同表位的两种抗体也可用于构建双特异性抗体以治疗表达CCR8的癌症/肿瘤。

[0199] 如本文所用,在对受试者进行两种或两种以上治疗的情况下,术语“联合”指的是使用一种以上的疗法。术语“联合”的使用并不限制向受试者施用的疗法的顺序。例如,第一疗法(例如,本文所述的组合物)可以在向受试者施用第二疗法之前(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、16小时、24小时、48小时、72小时、96小

时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周之前)、同时或之后(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、16小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周之后)施用。

[0200] 在另一个一般方面中,本发明涉及一种在受试者中确定CCR8水平的方法。所述方法包括(a)从所述受试者获得样品;(b)将所述样品与本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段接触;和(c)在所述受试者中确定CCR8的水平。

[0201] 如本文所用,“样品”指从受试者分离的生物样品,并且可以包括但不限于全血、血清、血浆、血细胞、内皮细胞、组织活检(例如,癌症组织)、淋巴液、腹水、间质液、骨髓、脑脊液、唾液、粘液、痰液、汗液、尿液或任何其他分泌物、排泄物或其他体液。“血液样品”指全血或其任何部分,包括血细胞、血清和血浆。例如,样品可以包含Treg细胞。

[0202] 在某些实施方式中,受试者中CCR8的水平可以利用选自但不限于Western blot测定、免疫组织化学(IHC)和ELISA的测定来确定。相对蛋白水平可以通过利用Western blot分析和IHC来确定,绝对蛋白水平可以利用ELISA来确定。当确定CCR8的相对水平时,CCR8的水平可以在至少两个样品之间确定,例如,在不同时间点来自同一受试者的样品之间,在同一受试者的不同组织的样品之间和/或在不同受试者样品之间。或者,当确定CCR8的绝对水平时,如通过ELISA,可以通过在测试样品之前建立ELISA的标准来确定样品中CCR8绝对水平。本领域技术人员将理解使用哪种分析技术来确定来自使用本发明的抗体或其抗原结合片段的受试者的样品中CCR8的水平。

[0203] 利用测定受试者样品中CCR8水平的方法可以诊断疾病中的CCR8异常(升高、降低或不足)水平,并做出适当的治疗决定。此类疾病可以是癌症。此外,通过监测受试者中CCR8的水平,可以基于对特定疾病中和/或特定疾病进展期间CCR8水平的了解来确定发展如上所述的疾病的风险。

[0204] 实施方式

[0205] 本发明还提供了下述非限制性实施方式。

[0206] 实施方式1是一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含重链互补性决定区1(HCDR1)、HCDR2、HCDR3、轻链互补性决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,其具有以下多肽序列:

[0207] (1)分别为SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6;

[0208] (2)分别为SEQ ID NO:13、2、14、4、28和6;

[0209] (3)分别为SEQ ID NO:13、2、15、4、5和6;

[0210] (4)分别为SEQ ID NO:16、17、18、29、30和6;

[0211] (5)分别为SEQ ID NO:19、20、21、4、5和6;

[0212] (6)分别为SEQ ID NO:22、23、24、31、5和32;或者

[0213] (7)分别为SEQ ID NO:25、26、27、33、34和35;

[0214] 其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8,优选特异性结合人CCR8。

[0215] 实施方式2是实施方式1的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:7、36、38、40、42、44或46至少95%相同的多肽序列,或轻链可变区,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:8、37、39、41、43、45或47至少95%相同的多肽序列。

[0216] 实施方式3是实施方式1或实施方式2的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0217] (1) 具有SEQ ID NO:7的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:8的多肽序列的轻链可变区;

[0218] (2) 具有SEQ ID NO:36的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:37的多肽序列的轻链可变区;

[0219] (3) 具有SEQ ID NO:38的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:39的多肽序列的轻链可变区;

[0220] (4) 具有SEQ ID NO:40的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:41的多肽序列的轻链可变区;

[0221] (5) 具有SEQ ID NO:42的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:43的多肽序列的轻链可变区;

[0222] (6) 具有SEQ ID NO:44的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:45的多肽序列的轻链可变区;或者

[0223] (7) 具有SEQ ID NO:46的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:47的多肽序列的轻链可变区。

[0224] 实施方式4是实施方式1-3中任一项的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是嵌合的和/或人的或人源化的。

[0225] 实施方式5是实施方式4的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链互补性决定区1(HCDR1)、HCDR2、HCDR3、轻链互补性决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,其具有以下多肽序列:

[0226] (1) 分别为SEQ ID NO:1、48、49、50、51和6;

[0227] (2) 分别为SEQ ID NO:1、2、49、4、5和6;

[0228] (3) 分别为SEQ ID NO:1、2、49、50、51和6;

[0229] (4) 分别为SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6;或者

[0230] (5) 分别为SEQ ID NO:1、48、49、50、51和6。

[0231] 实施方式6是实施方式5的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:9、52、53、54、55、56、57、58、59或60至少95%相同的多肽序列,或轻链可变区,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:10、61、62或63至少95%相同的多肽序列。

[0232] 实施方式7是实施方式6的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

[0233] (1) 具有SEQ ID NO:9的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10的多肽序列的轻链可变区;

[0234] (2) 具有SEQ ID NO:52的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:63的多肽序列的轻链可变区;

[0235] (3) 具有SEQ ID NO:52的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10的多肽序列的轻链可变区;

[0236] (4) 具有SEQ ID NO:53的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10的多肽序列

的轻链可变区；

[0237] (5) 具有SEQ ID NO:54的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:63的多肽序列的轻链可变区；或者

[0238] (6) 具有SEQ ID NO:59的多肽序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:62的多肽序列的轻链可变区。

[0239] 实施方式8是实施方式1-7中任一项的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段能够通过抗体依赖性细胞毒性(ADCC);抗体依赖性细胞吞噬作用(ADPC)诱导效应物介导的肿瘤细胞裂解;和/或介导缀合药物的募集;和/或与另一种具有肿瘤杀伤作用的mAb或其抗原结合片段形成双特异性抗体。

[0240] 实施方式9是实施方式1-8中任一项的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合食蟹猴CCR8。

[0241] 实施方式10是一种分离的双特异性抗体或其抗原结合片段,其包含实施方式1-9中任一项的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0242] 实施方式11是一种分离的核酸,其编码实施方式1-9中任一项的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0243] 实施方式12是一种分离的核酸,其编码实施方式10的双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0244] 实施方式13是一种载体,其包含实施方式11或实施方式12的分离的核酸。

[0245] 实施方式14是一种宿主细胞,其包含实施方式13的载体。

[0246] 实施方式15是一种药物组合物,其包含实施方式1-9中任一项的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段或实施方式10的双特异性抗体或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。

[0247] 实施方式16是一种在有此需要的受试者中靶向癌细胞表面上的CCR8和/或治疗癌症的方法,其包括向所述受试者施用实施方式15的药物组合物。

[0248] 实施方式17是实施方式16的方法,其中所述癌症是实体瘤,优选具有浸润性T细胞的实体瘤,更优选具有浸润性T reg细胞的实体瘤,更优选具有表达CCR8的高抑制性T reg细胞的实体瘤,最优选具有发生了自然杀伤(NK)细胞浸润的过表达CCR8的浸润性高抑制性T reg细胞的实体瘤。

[0249] 实施方式18是实施方式16或实施方式17的方法,其中所述癌症选自以下:肺癌、头颈癌、食管癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、肾癌和黑色素瘤。

[0250] 实施方式19是实施方式16指18中任一项的方法,其中所述受试者包含表达CCR8的Treg细胞。

[0251] 实施方式20是一种生产实施方式1-9中任一项的单克隆抗体或其抗原结合片段或者实施方式10的双特异性抗体或其抗原结合片段的方法,其包括在生产单克隆抗体或其抗原结合片段或者双特异性抗体或其抗原结合片段的条件下培养包含编码所述单克隆抗体或其抗原结合片段或者所述双特异性抗体或其抗原结合片段的核酸的细胞,并且从所述细胞或培养物中回收所述单克隆抗体或其抗原结合片段或者所述双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0252] 实施方式21是一种生产包含实施方式1-9中任一项的单克隆抗体或其抗原结合片

段或者实施方式10所述的药物组合物的方法,其包括将所述单克隆抗体或其抗原结合片段或者所述双特异性抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体组合以获得所述药物组合物。

[0253] 实施方式22是一种确定受试者中CCR8的水平的方法,所述方法包括:

[0254] a. 从所述受试者获得样品;

[0255] b. 将所述样品与实施方式1-9中任一项的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段接触;和

[0256] c. 确定所述受试者中CCR8的水平。

[0257] 实施方式23是实施方式22的方法,其中所述样品是组织样品或血液样品,任选地其中所述组织样品是癌症组织样品。

[0258] 实施方式24是实施方式22的方法,其中所述样品包含Treg细胞。

[0259] 实施例

[0260] 实施例1: 抗体制备

[0261] 免疫接种:

[0262] 抗CCR抗体是通过四次DNA注射免疫Balb/c小鼠,然后两到四次强化表达hCCR8受体的稳定M300.19细胞而产生的。在CelliGo™平台中将显示出高特异性滴度(>10,000)的小鼠进行单B细胞分选。

[0263] 通过CelliGo平台的B细胞分选:

[0264] 在37°C、5%CO₂下将来自免疫小鼠的脾细胞在X-vivo 15培养基(补充了1%青霉素/链霉素、2x L-谷氨酰胺、10%低IgG血清、100ng/mL IL-2和2.5μg/mL R848)中体外活化5天。使用泛B分离试剂盒(Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, North-Rhine-Westphalia, Germany)富集B细胞,并且在使用HiFiBio Celligo平台(HiFiBio; Cambridge, MA)分选前用Celltrace™Violet试剂(ThermoFisher; Waltham, MA)标记。使用HiFiBio微流体技术开发了一种基于细胞的筛选测定法,以检测和分选与液滴中的靶细胞结合的特异性B细胞。

[0265] 通过RT-PCR和PCR从液滴中的单个B细胞中扩增VH/VL,并使用Absolution HiFiBio软件(HiFiBio)分析序列。

[0266] 在人IgG1支架中产生嵌合抗体,并通过荧光活化细胞分选(FACS)筛选与亲本细胞相比在CCR8高拷贝细胞(稳定的CCR8CHO-K1细胞系,Perkin-Elmer; Waltham, MA)上的特异性结合。

[0267] 在25种特异性抗hCCR8抗体中,鉴定出一组具有可变生物学性质的抗体(图1-6)。

[0268] 抗体的序列如下所示。

[0269] 表1: 抗CCR8 mAb的重链可变区的序列

[0270]

mAb 克隆	VH 序列	SEQ ID NO:
HFB11-10	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAASGFRFNTNAMNWVRQAPGKDLEWVARIRSKS NNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNVKTEDTAMYYCVRGSDNNYYA MDYWGQGTSTVTVSS	7
HFB11-2	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFSFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKS NNYATYYADSVKDRFTISRDDSERMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRGGSYYSNHYF DYWGQGTTLTVSS	36
HFB11-3	EVQLVESGGGLVQPQGSLLKLSAASGFSFNTYAMNWVRQAPGKGLQWVARIRSKS NNYATYYADSVKDRFTISRDDSESMLYLQMNNLKTEDAAMYYCVRGKDANYFYA MDYWGQGTSTVTVSS	38
HFB11-5	EVQLVESGGGLVQPRGSLKLSCTASGFSFNAYAMNWVRQAPGKLEWVARIRTKS NNYATYYADSVKDRFTISRDDSESMLYLQMKNLKTEDTAMYYCVRGGYGNGGGYY FDYWGQGTTLTVSS	40
HFB11-8	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAASGFRFNTNAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKS NNYATHYVDSVKDRFTVSRDDSQSMLYLQMNNLKAEDTAMYYCVRGSDNNYY AMDYWGQGTSTVTVSS	42
HFB11-19	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTDYIIHWVKQRSGQGLEWIGWFSRNN YVKYNERFTDKATLTADKSSNTVYMELSSLTSEDSAVYFCSRHGRNSIGFAYWGQG TLVTVSA	44
HFB11-21	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFISYWMHWVKRPRGLEWIGRIDPNSG KTKYNEKFKTKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSSDSAVYYCAREGWGDYWGQGT LTVSS	46

[0271] 表2:抗CCR8 mAb的轻链可变区的序列

[0272]

mAb 克隆	VL 序列	SEQ ID NO:
HFB11-10	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISSCRSSKLLHSNGNTLYWFLQRPQGSPQLLIYRMS NLASGVPDFRSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIK	8
HFB11-2	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISSCRSSKLLHSNGNTLYWFLQRPQGSPQLLIYQMS NLASGVPDFRSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLELK	37
HFB11-3	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISSCRSSKLLHSNGNTLYWFLQRPQGSPQLLIYRMS NLASGVPDFRSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLELK	39
HFB11-5	DIVMTQAAPSVTVTPGESASISCRSSKLLHRNGNSYLYWFLQRPQGSPQLLIYRISN LASGVPDFRSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIK	41
HFB11-8	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISSCRSSKLLHSNGNTLYWFLQRPQGSPQLLIYRMS NLASGVPDFRSGSGSGTSFTLRISRVEEDVGVYYCMQHLEYPFTFGSGTKLEIK	43
HFB11-19	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISSCRSSKLLNSNGNTLYWFLQRPQGSPQLLIYRMS NLASGVPDFRSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK	45
HFB11-21	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMHWYQKPKQPRLLIYRASN LASGIPARFSGSGSSTDFLTINPVETDDIATYYCQSNKDPRTFGGGTKLEIK	47

[0274] 表3:如通过Kabat和IMGT方法确定的抗CCR8 mAb的重链的CDR区1-3

[0275]

VH	HC CDR1	SEQ ID NO:	HC CDR2	SEQ ID NO:	HC CDR3	SEQ ID NO:
HFB11-10	GFRFNTNA	1	IRSKSNYYATY	2	VRGSDNNYYAMDY	3
HFB11-2	GFSFNYYA	13	IRSKSNYYATY	2	VRGGSYYSNHYFDY	14
HFB11-3	GFSFNYYA	13	IRSKSNYYATY	2	VRGKDANYFYAMDY	15
HFB11-5	GFSFNYYA	16	IRTKSNYYATY	17	VRGGYGNGGGYYFDY	18
HFB11-8	GFRFNTNA	19	IRSKSNYYATH	20	VRGSDNNYYAMDY	21
HFB11-19	GYTFTDYI	22	FSPRNYYVK	23	SRHGRNSIGFAY	24
HFB11-21	GYTFISYW	25	IDPNSGKTK	26	AREGWGDY	27

[0276] 表4:如通过Kabat和IMGT方法确定的抗CCR8 mAb的轻链的CDR区1-3

VL	VL CDR1	SEQ ID NO:	VL CDR2	SEQ ID NO:	VL CDR3	SEQ ID NO:
[0277] HFB11-10	KSLLSHNGNTY	4	YRMSNL	5	MQHLEYPFT	6
HFB11-2	KSLLSHNGNTY	4	YQMSNL	28	MQHLEYPFT	6
HFB11-3	KSLLSHNGNTY	4	YRMSNL	5	MQHLEYPFT	6
HFB11-5	KSLLSHRNGNSY	29	YRISNL	30	MQHLEYPFT	6
HFB11-8	KSLLSHNGNTY	4	YRMSNL	5	MQHLEYPFT	6
HFB11-19	KSLLSNSGNTY	31	YRMSNL	5	MQHLEYPYT	32
HFB11-21	ESVDNYGISF	33	YRASNL	34	QQSNKDPRT	35

[0278] 实施例2:特异性结合表达CCR8的细胞的抗CCR8单克隆抗体

[0279] 简言之,在4°C下将纯化的抗体(在PBS中范围从30mM,3倍稀释)与 1×10^5 个稳定表达CCR8的CHOK1细胞(Perkin Elmer;Waltham,MA)孵育30分钟。在MACS缓冲液(Miltenyi; Bergisch Gladbach,Germany)中洗涤后,在PBS中使用12nM第二抗人AF647抗体(Jackson ImmunoResearch;West Grove,PA)孵育30分钟。在MACS缓冲液中洗涤后,将细胞球团重悬在50 μ l PBS中,并在iQue细胞仪(Sartorius;Goettingen,Germany)上使用Forecyt软件(Intellicyt;Ann Arbor,MI)分析。来自单个细胞的AF647通道的荧光平均值显示在图1中。

[0280] 在亲本CHOK1细胞上没有检测到信号;因此,所测试的抗体对hCCR8是特异性的(图1B)。从图1A中所示的滴定曲线获得的EC₅₀值在0.5至9nM的范围内(图1C)。

[0281] 实施例3:抗-CCR8单克隆抗体识别N末端以及参与蛋白构象的环1

[0282] 为绘制CCR8的表位,产生表达嵌合蛋白的构建体,所述嵌合蛋白包含与最接近的趋化因子受体CCR4(UniProt/Swiss-Prot:P51679(SEQ ID NO:12))融合的人CCR8的部分(UniProt/Swiss-Prot:P51685(SEQ ID NO:11))。所得蛋白含有来自人CCR4的N-末端结构域(SEQ ID NO:12的氨基酸1-40)、胞外域1(SEQ ID NO:12的氨基酸100-112(ECL1))、胞外域2(SEQ ID NO:12的氨基酸177-205(ECL2))或胞外域3(SEQ ID NO:12的氨基酸269-286(ECL3)),其余序列来自人CCR8(SEQ ID NO:11)。构建体在含有可切割的细胞内GFP标签的pcDNA3.1载体中制备,并且构建体在ExpiHEK293细胞的表面瞬时表达。将纯化的抗体(50nM)与用人、小鼠或cynoCCR8-GFP蛋白瞬时转染的 1×10^5 个的ExpiHEK293细胞在4°C下孵育30分钟。洗涤后,在PBS中使用12nM第二抗人AF647抗体(Jackson ImmunoResearch;West Grove,PA)孵育30分钟。洗涤后,将细胞球团重悬在50 μ L PBS中,并在iQue细胞仪(Sartorius;Goettingen,Germany)上使用Forecyt软件(Intellicyt;Ann Arbor,MI)分析。特异性信号的荧光强度的平均值表示在图2中的GFP+细胞中。

[0283] 所有抗体均特异性针对人CCR8,并且不与最接近的家族成员CCR4交叉反应。抗体在CCR8/CCR4突变体上显示出相似的特征。当N-末端结构域被CCR4取代时,抗CCR8抗体失去反应性。胞外域1(ECL1)被替代后结合活性显著降低。然后,由于大多数抗体没有与cynoCCR8交叉反应(图3),并且ECL1与人CCR8中的ECL1 100%相同,这表明ECL1环在蛋白构象中起着关键作用,但可能不是抗体的表位。

[0284] 由于ECL2和ECL3的替代没有影响,因此确定产生的抗CCR8抗体包含位于N-末端结构域的表位。

[0285] 实施例4:抗CCR8单克隆抗体特异性针对人CCR8蛋白并且能够与小鼠和/或cynoCCR8受体交叉反应

[0286] 简言之,在4°C下将纯化的抗体(饱和浓度50nM,图3A,或从100nM开始3倍稀释的浓

度范围,图3B-3C)与 1×10^5 个ExpiHEK293细胞孵育30分钟,ExpiHEK293细胞用通过可切割接头融合至GFP蛋白的人(SEQ ID NO:11;Uniprot/Swiss-Prot:P51685)、小鼠CCR8(SEQ ID NO:64;Uniprot/Swiss-Prot:P56484)或cynoCCR8(SEQ ID NO:65;Uniprot/Swiss-Prot:G7NYJ2)瞬时转染。洗涤后,在PBS中使用12nM第二抗人AF647抗体(Jackson ImmunoResearch;West Grove,PA)孵育30分钟。洗涤后,将细胞球团重悬在50 μ L PBS中,并在iQue细胞仪(Sartorius;Goettingen,Germany)上使用Forecyt软件(Intellicyt;Ann Arbor,MI)分析。特异性信号的荧光强度的平均值表示在图3A-3C中的GFP+细胞中。在饱和浓度下测试的所有抗体显示在图3A中。针对小鼠CCR8和cynoCCR8的交叉反应性抗体的滴定曲线分别存在于图3B和图3C中。

[0287] 在抗CCR8抗体中观察到不同的交叉反应谱:一个主要组,包括HFB11-3、HFB11-5、HFB11-8和HFB11-10,其仅对人蛋白具有特异性,不与其他物种发生交叉反应。HFB11-2对小鼠CCR8蛋白具有交叉反应性;HFB11-19识别cynoCCR8蛋白;和HFB11-21能够结合小鼠和cyno CCR8蛋白。据信,这些抗体识别N末端结构域中的不同表位。小鼠CCR8抗体的滴定曲线针对HFB11-2显示出相似的结合性质,其具有亚纳摩尔 EC_{50} ,但是针对HFB11-21显示出更低的结合效力,其具有53nM的 EC_{50} (图3B)。另一方面,该抗体显示出对cyno CCR8受体更高的结合性质,具有15.8nM的 EC_{50} 。HFB11-19是更高效的cyno CCR8结合剂,其具有1.8nM的 EC_{50} (图3C)。

[0288] 实施例5:抗CCR8抗体阻止CCL1与表达CCR8的细胞的结合

[0289] 评估了阻断CCL1与表达人CCR8的细胞结合的能力。在4 $^{\circ}$ C下,将几个浓度(稀释范围从100nM开始)的抗CCR8抗体添加到稳定表达CCR8的细胞(CHOK1,Perkin Elmer)中,持续30分钟。在MACS缓冲液中洗涤后,添加30nM的hCCL1-AF647(Almac),并在4 $^{\circ}$ C下孵育45分钟。在MACS缓冲液中洗涤后,将细胞球团重悬在50 μ L中,随后在iQue细胞仪(Sartorius;Goettingen,Germany)上使用Forecyt软件(Intellicyt,Ann Arbor,MI)读取。在没有抗体的情况下获得最大平均荧光强度(MFI)以反映100%的CCL1结合。将AF647通道的MFI用于计算CCL1阻断%(公式= $100 - (MFI_{\text{样品}} * 100 / MFI_{\text{CCL1单独}})$)。图4显示了证明5/7抗CCR8抗体阻断CCL1与CCR8结合的结果。

[0290] HFB11-19和HFB-21都是cyno交叉反应性的,其不能阻断hCCL1与在细胞表面表达的hCCR8的结合,而所有其他抗体都有效地阻断了hCCL1, IC_{50} 值在约0.4至1.4nM范围内(图4B)。这表明,与N末端结构域上的其他抗体相比,HFB11-19和HFB11-21共享不同的表位。

[0291] 实施例6:抗CCR8抗体抑制胞内 Ca^{2+} 通量

[0292] CCR8低拷贝细胞(M300.19小鼠前B细胞)在时间0秒用100nM的HFB11-10抗体(灰色箭头,图5D和图5G)、HFB11-3抗体(灰色箭号,图5或缓冲液(图5E))处理,随后孵育90秒并添加1nM的CCL1(透明箭头,图5B-5D)或10nM的CCL1(透明箭头号,图5E-5G)。仅使用缓冲液的阴性对照显示在图5A中(透明箭头)。

[0293] 图5C和图5D证明两种抗体干扰CCR8-M300.19细胞中CCL1诱导的 Ca^{2+} 尖峰,在1nM CCL1下具有完全的信号抑制。随着CCL1浓度增加到10nM,分别观察到对HFB11-3和HFB11-10的61%和77.5%的部分抑制(图5F和图5G)。还证明了阻断CCL1结合的抗CCR8抗体也阻断了趋化因子诱导的细胞内信号传导。

[0294] 实施例7:抗CCR8抗体能够在抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC)报告生物测定中接

合CD16

[0295] 将表达CCR8的CHOK1细胞(Perkin Elmer)作为ADCC报告生物测定(Promega)中的靶细胞。简言之,将抗CCR8抗体(范围从30nM开始,3倍稀释)靶细胞(25000/孔)与表达CD16和荧光素酶报告基因的Jurkat工程化细胞在E/T=3:1下共培养。在37°C、5%CO₂下孵育6小时后,添加Bio-glo试剂并在室温下孵育5分钟,然后使用Tecan酶标仪读取生物发光。RLU信号在图中显示(图6A)。

[0296] 所有抗CCR8抗体都能够以不同效力接合CD16。作为非阻断抗体的HFB11-19和HFB11-21与其他抗体相比显示出较低的效力(较低的E_{max}和EC₅₀)。HFB11-2、HFB11-3、HFB11-5、HFB11-8和HFB11-10显示出高效力,EC₅₀值在0.1至0.3nM范围内,E_{max}在>25000至>40000RLU之间(图6B)。

[0297] 实施例8:人源化抗CCR8抗体与表达CCR8的细胞强结合

[0298] 在4°C下将纯化的抗体(以ADCC增强的形式生产)与1×10⁵个hCCR8-CHOK1稳定细胞或亲代CHOK1细胞(在MACS缓冲液中范围从50nM,3倍稀释)孵育30分钟。洗涤后,以在MACS缓冲液中12nM的第二抗人AF647抗体孵育30分钟。洗涤后,将细胞球团重悬在50μL MACS缓冲液中,并在iQue细胞仪(Sartorius, Goettingen, Germany)上使用Forecyt软件(Intellicyt, Ann Arbor, MI)分析样品。在单细胞门控中针对AF647通道的荧光平均值表示在图7中。

[0299] 滴定曲线显示,人源化抗CCR8抗体候选物都能够结合表达CCR8的细胞,对于人源化变体Hz25、HZ28、Hz29、Hz35、Hz37和Hz4,分别具有0.40、0.30、0.37、0.21、0.58和0.10nM的非常低的EC₅₀,而没有同种型抗体的背景(图7A和图7B)。

[0300] 人源化抗体序列如下所示:

[0301] 表5:H11-10 mAb的人源化重链可变区的序列

VH	VH 序列	SEQ ID NO:
H11-10 VH10	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIR SKSNSYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSDNN YYYAMDYWGQGTITVTVSS	9
H11-10 VH1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFRFNTNAMNWVRQASGKGLEWVGRIR SKSNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSDNN YYYAMDYWGQGTITVTVSS	52
H11-10 VH2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIR SKSNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSDNN	53

[0302]

	YYYAMDYWGQGTTVTVSS	
[0303] H11-10 VH3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFRFNTNAMNWVRQAPGKGLEWVARIR SKSNYYATYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRGSDNN YYYAMDYWGQGTTVTVSS	54
H11-10 VH4	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFRFNTNAMNWFRQAPGKGLEWVARIRS KSNNYATYYTASVKGRFTISRDKSIAIYLMNSLKTEDTAVYYCVRGSDNNY YYAMDYWGQGTTVTVSS	55
H11-10 VH5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFRFNTNAMNWVRQAPGDLEWVARIR SKSNYYATYYSQKFGGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCVRGSDNN YYYAMDYWGQGTTVTVSS	56
H11-10 VH6	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAASGFRFNTNAMNWVRQPPGKGLEWVGRIRS KSNNYATYYNPSLKSRTISRDKSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCVRGSDNNY YYAMDYWGQGTTVTVSS	57
H11-10 VH8	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTASGFRFNTNAMNWVRQPPGKALEWVARIRS KSNNYATYYSTSVKTRLTISKDTSKNQLVLTMTNMDPVDATVYYCVRGSDNNY YYAMDYWGQGTTVTVSS	58
H11-10 VH9	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKGLEWVGRIR SKSNSYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSDNN YYYAMDYWGQGTTVTVSS	59
H11-10 VH11	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFRFNTNAMNWVRQAPGKLEWVARIR SKSNYYATYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRGSDNN YYYAMDYWGQGTTVTVSS	60

[0304] 表6:H11-10 mAb的人源化轻链可变区的序列

VL	VL 序列	SEQ ID NO:
H11-10 VL1	DIVMTQSPLSLPVTPEPAPISCRSSQSLHNSGNTYLYWFLQKPGQSPQLLIYRM SNRASGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGQGTKLEI K	10
[0305] H11-10 VL2	EIVMTQTPLSLSVTPGEQASISCRSSKSLHNSGNTYLYWFLQKARPSSTLLIYRM SNLASGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGQGTKLEI K	61
H11-10 VL3	DIQMTQSPSAMSVSVDGDRVTITCRSSKSLHNSGNTYLYWFQKPKGKVPKLLIYR MSNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISVQPEDVATYYCMQHLEYPFTFGQGTKLEI K	62
H11-10 VL4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRSSKSLHNSGNTYLYWFQKPGQAPRLLIYRM SNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDVAVYYCMQHLEYPFTFGQGTKLEIK	63

[0306] 表7:如通过Kabat和IMGT法确定的人源化抗CCR8 mAb的人源化重链的CDR区1-3

VH	HC CDR1	SEQ ID NO:	HC CDR2	SEQ ID NO:	HC CDR3	SEQ ID NO:
H11-10 VH10	GFRFNTNA	1	IRSKSNSYATY	48	TRGSDNNYYYAMDY	49
H11-10 VH1	GFRFNTNA	1	IRSKSNYYATY	2	TRGSDNNYYYAMDY	49
H11-10 VH2	GFRFNTNA	1	IRSKSNYYATY	2	TRGSDNNYYYAMDY	49
[0307] H11-10 VH3	GFRFNTNA	1	IRSKSNYYATY	2	VRGSDNNYYYAMDY	3
H11-10 VH4	GFRFNTNA	1	IRSKSNYYATY	2	VRGSDNNYYYAMDY	3
H11-10 VH5	GFRFNTNA	1	IRSKSNYYATY	2	VRGSDNNYYYAMDY	3
H11-10 VH6	GFRFNTNA	1	IRSKSNYYATY	2	VRGSDNNYYYAMDY	3
H11-10 VH8	GFRFNTNA	1	IRSKSNYYATY	2	VRGSDNNYYYAMDY	3
H11-10 VH9	GFRFNTNA	1	IRSKSNSYATY	48	TRGSDNNYYYAMDY	49
H11-10 VH11	GFRFNTNA	1	IRSKSNYYATY	2	VRGSDNNYYYAMDY	3

[0308] 表8:如通过Kabat和IMGT法确定的人源化抗CCR8 mAb的人源化轻链的CDR区1-3

VL	VL CDR1	SEQ ID NO:	VL CDR2	SEQ ID NO:	VL CDR3	SEQ ID NO:
[0309] H11-10 VL1	QSLHNSGNTY	50	YRMSNR	51	MQHLEYPFT	6
H11-10 VL2	KSLHNSGNTY	4	YRMSNL	5	MQHLEYPFT	6
H11-10 VL3	KSLHNSGNTY	4	YRMSNL	5	MQHLEYPFT	6
H11-10 VL4	KSLHNSGNTY	4	YRMSNL	5	MQHLEYPFT	6

[0310] 实施例9:人源化抗CCR8抗体阻断CCL1与CCR8结合

[0311] 在4°C下,将 1×10^5 个稳定CHOK1.hCCR8细胞(Perkin Elmer)与一系列人源化抗CCR8抗体(以ADCC增强形式产生)或同种型抗体(浓度范围从33nM,3倍稀释)孵育30分钟。以300g离心3分钟后,将细胞用30nM用AF647标记的人CCL1配体(50 μ L)(Almac)重悬,在4°C下孵育45分钟。洗涤2次后,在iQue细胞仪(Sartorius,Goettingen,Germany)上使用Forecyt软件(Intellicyt,Ann Arbor,MI)通过流式细胞术分析细胞。如实施例5中所述计算阻断%,并且如图8中所示。

[0312] ADCC增强形式的人源化抗CCR8抗体能够阻断人CCL1与表达CCR8的细胞的结合,针对HFB11-10Hz4、HFB11-10Hz25、HFB11-10Hz28、HFB11-10Hz29、HFB11-10Hz35和HFB11-10Hz37抗体的有效 IC_{50} 分别为0.09、1.09、0.39、0.68、0.49和0.81nM(图8)。

[0313] 实施例10:人源化HFB11-10Hz37抗CCR8抗体在ADCC报告测定上接合CD16F和V同种异型

[0314] 使用稳定的hCCR8-CHOK1细胞(Perkin-Elmer)作为靶细胞,并与表达CD16(FF或VV同种型)和来自ADCC报告生物测定试剂盒的报告基因NFAT的工程化稳定Jurkat细胞以3:1的E/T比(Promega)共培养。还将一系列HFB11-10Hz37抗体从30nM(3倍系列稀释)添加到培养物中。在37°C和5%CO₂下孵育6小时后,根据供应商的建议添加BioGlo荧光素酶底物,并使用Tecan酶标仪在孵育5分钟后读取发光信号。生物发光信号在图中报告为RLU(图9)。

[0315] 人源化抗hCCR8抗体能够在ADCC报告测定介导的靶细胞杀伤中接合CD16 F和V同种异型两者。正如所预期的那样,使用高亲和力Fc γ 受体(VV同种异型)观察到更高效力的 EC_{50} 为0.014nM,而低亲和力Fc γ 受体(FF同种异型)增加至0.080nM(图9)。

[0316] 实施例11:人源化抗CCR8抗体在表达低拷贝CCR8的细胞上介导的ADCC

[0317] 使用NK细胞分离试剂盒(Miltenyi)从健康人PBMC中分离NK细胞。在37°C,5%CO₂下在24孔板中将每孔200万个NK细胞在IL2RPMI培养基中活化约30小时。表达低拷贝数CCR8的细胞(稳定转染的M300.19小鼠前B细胞)用Celltrace™FarRed(Invitrogen;Waltham,MA)标记,然后在37°C下在U形底96孔板中与NK细胞(E/T比2:1)和一定范围的HFB11-10抗体浓度(ADCC增强形式的人源化和非人源化)共培养16小时。在使用cytoflex细胞仪(Beckman Coulter)读取荧光之前,用Nucgreen标记死细胞。死靶细胞百分比以双阳性细胞评估,特异性靶细胞裂解百分比以(使用抗体的靶死细胞%-不使用抗体的靶死细胞%) \times 100/(100-不使用抗体的靶死细胞%)。在靶细胞与不使用抗体的NK细胞共培养的条件下评估自发性细胞死亡。

[0318] 图10显示了由人源化抗CCR8抗体介导的特异性ADCC NK杀伤。人源化变体和亲本抗体(以ADCC增强的形式)在测定中显示出介导ADCC NK杀伤表达CCR8的低拷贝细胞的高效力(E:T比3:1)。针对Hz25抗体(来自n=3个供体的平均值), EC_{50} 较低,范围从0.003nM(针对Hz29、Hz35、亲本Ab)至0.007nM。所有人源化抗体在使用原代NK细胞的ADCC测定中显示出非常高的活性。

[0319] 实施例12:人源化抗CCR8抗体HFB101110的体外表征

[0320] 进一步研究了与HFB11-10相关的非岩藻糖基化的人源化抗CCR8抗体HFB101110。在下述实施例中,抗CCR8抗体HFB101110和HFB11-10可互换使用。

[0321] 如图11A-11G所示,对抗CCR8 mAb HFB101110进行了更详细的评估。经确证,通过

流式细胞术测量,抗体在高拷贝(CHOK1-hCCR8,约30,000个受体/细胞,左)和低拷贝(M300.19-hCCR8,约2,000个受体/细胞,右)细胞上均与CCR8具有强结合, EC_{50} 分别为0.23nM和0.26nM(图11A)。将针对HFB101110的亲本抗体作为非岩藻糖基化HFB101110的阳性对照,针对HFB101110的亲本抗体的形式为在Fc区具有正常糖基化和DE突变的hIgG1抗体,以增强ADCC活性(HFB101110-hIgG1-DE)。HFB101110能够以相似的亚nM EC_{50} 值结合表达高拷贝和低拷贝hCCR8的细胞。

[0322] 抗CCR8 mAb HFB101110诱导针对M300.19-hCCR8细胞的ADCC活性。从PBMC分离的外源性原代NK细胞以3:1的效应物与靶点的比例加入,并在共培养16h后使用NucGreen染色通过流式细胞术对死细胞进行定量。显示了使用来自3个不同供体的NK细胞的实验平均值。将HFB101110-hIgG1-DE和另一种抗hCCR8 DE形式hIgG1抗体作为阳性对照(图11B)。

[0323] 通过流式细胞术评价HFB101110与相关趋化因子受体CCR4的结合,使用抗CCR4抗体莫格利珠单抗(mogamulizumab)作为阳性对照。HFB101110显示不与hCCR4结合,表明该抗体对hCCR8的特异性识别(图11C)。进行结构域交换实验以鉴定由HFB101110识别的CCR8的区域。使用相关趋化因子受体CCR4的同源结构域替代hCCR8蛋白,并且在293细胞中表达所得嵌合蛋白,通过流式细胞术评估HFB101110的结合(图11D)。基于这些实验,确定HFB101110识别hCCR8的N末端胞外结构域。

[0324] 如图11E中所示,通过流式细胞术测量HFB101110阻断hCCL1与hCCR8的结合。通过transwell迁移测定测量HFB101110介导的对重组hCCL1诱导的CCR8+细胞趋化性的阻断。CCL1以30nM的浓度存在,同时改变存在的抗体的量。将HFB101110-hIgG1-DE以及另一种人源化变体作为阳性对照(图11F)。

[0325] 如图11G中所示,评价由向CCR8+细胞添加hCCL1诱导的HFB101110介导的钙通量的阻断。在存在或不存在10 μ g/mL HFB101110的情况下,在箭头所示的时间将10nM hCCL1添加到CCR8+细胞中。

[0326] 实施例13:人源化抗CCR8抗体显示抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)活性

[0327] 在CD14+小珠分离(Miltenyi)后,从人PBMC分离原代巨噬细胞。2M个细胞/孔接种到具有无血清RPMI 1640培养基的6孔板中,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下培养1小时。然后将培养基换成活化培养基(RPMI 1640,10%FBS,1%青霉素/链霉素,50ng/mL M-CSF),每2天更换一次培养基,持续1周。在活化最后2天,将IL13添加到活化培养基中。用Celltrace™紫(Invitrogen)标记靶细胞(稳定hCCR8.M300.19细胞)(在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂下孵育20分钟)。在完全培养基中洗涤后,在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂下用饱和浓度(100nM)的人源化抗CCR8抗体孵育CCR8细胞15分钟,然后与活化的巨噬细胞共培养4小时。用抗CD11b-APC抗体(Biolegend)对巨噬细胞染色,然后使用Cytoflex细胞仪(Beckman Coulter)用流式细胞术分析。使用FlowJo软件将吞噬细胞鉴定为双阳性细胞。

[0328] 如图12中所示,大约15%的细胞在四(4)小时的孵育后被巨噬细胞吞噬或处于吞噬过程中(图12)。人源化抗CCR8抗体HFB11-10Hz37通过使用原代巨噬细胞的ADCP机制特异性介导CCR8+细胞吞噬作用。

[0329] 实施例14:人源化抗CCR8抗体介导的在hCCR8-KI小鼠中对MC38细胞中的抗肿瘤活性

[0330] 小鼠和肿瘤细胞系:

[0331] 雌性8周龄C57BL/6小鼠购自Biocytogen Jiangsu Co.,Ltd (Jiangsu,China)。将MC38小鼠结肠癌细胞系用作体内肿瘤有效性研究(Biocytogen Jiangsu Co.,Ltd.)。对于所有描述的肿瘤实验,MC38细胞系在储存前传代两次,解冻,并在植入前传代两次。确定细胞不含支原体。

[0332] 本研究按照百奥赛图(Biocytogen)的机构动物管理及使用委员会(IACUC)根据实验动物护理评估和认证协会(AAALAC)的指导原则审查和批准的方案进行。

[0333] hCCR8 KI C57BL/6小鼠(8周龄,15-21克)在右前侧皮下注射0.1mL PBS中的MC38肿瘤细胞(5×10^5)。肿瘤植入后一周,每两周腹腔内注射10mg/kg人源化HFB11-10或同种型抗体,持续3周($n=8$ /组)。每周两次测量肿瘤体积(mm^3)和体重(见图13A,其说明了在hCCR8敲入小鼠中的体内有效性研究的示意图)。对于该研究,使用形式为mIgG2a抗体的HFB101110的非岩藻糖基化形式,以促进与小鼠Fc受体的接合。

[0334] 图13B-13D显示了在hCCR8-KI小鼠中使用来自结直肠癌的MC38细胞通过施用人源化抗CCR8抗体(图13C-13D)或同种型mIgG2a(图13B-13D)来评价抗肿瘤活性。从治疗开始后9天开始,与同种型对照相比,抗人CCR8治疗组的肿瘤生长显著减少($p < 0.01$,**)。此外,在8只小鼠中的3只从肿瘤植入后第11天起观察到肿瘤消退。总之,这些结果表明抗CCR8抗体显著减少肿瘤生长。

[0335] 实施例15:人源化抗CCR8抗体疗法重编程肿瘤微环境

[0336] 为了更好地定义作用机制,检测了抗CCR8抗体治疗引起的MC38肿瘤微环境(TME)的变化。如图14A-14F中所示,抗CCR8抗体治疗改变治疗小鼠中肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的组成。

[0337] 观察到抗CCR8抗体施用显著增加肿瘤浸润CD8+的百分比(*, p 值=0.0262,图14C)。此外,观察到CD8/Treg比率的显著增加(*, p 值=0.0240,图14D),进一步表明免疫平衡向有利于抗肿瘤免疫的方向倾斜。该治疗还略微增加了TME中NK细胞和CD4+效应T细胞的百分比(分别为图14E和图14B)。

[0338] 此外,抗CCR8抗体治疗在终点处没有显著减少Foxp3+CD4+(图14A),但是抗CRM8抗体治疗显著减少CCR8+Treg群(图14F),这证明了该药剂的靶向特异性作用。与同种型组相比,观察到58%的CCR8+Treg减少反映了FAC组中使用的人源化抗体的靶点占据正在竞争相同表位。

[0339] 实施例16:在来自肾细胞癌(RCC)患者和来自肺癌患者的人原代肿瘤的T细胞群中的CCR8表达

[0340] 将新鲜肿瘤浸润淋巴细胞消化并解离成单细胞悬液,计数并冷冻,然后进行分析。简言之,首先使用温和的MACS肿瘤解离试剂盒(Miltenyi)。将肿瘤切成小块并与酶混合物一起孵育,并使用温和的MACS(Miltenyi)消化组织。然后将样品以300g离心5分钟,用10mL冷培养基洗涤两次。然后在30 μ M下过滤样品,并在进一步分析之前将其重悬于冷的冷冻培养基(90%FBS和10%DMSO)中。将一份等分试样解冻,并与用于CCR8表型分型的抗体一起孵育。首先用活/死染料和FcBlock对样品进行染色。然后,用抗CD45、抗CD3、抗CD4、抗CD8、抗CD56、抗TIGIT抗体(Biolegend)和抗CCR8(BD)进行胞外染色。最后,透化样品并用FoxP3染色用于胞内染色。使用FLoJo软件通过流式细胞术对样品进行分析。

[0341] 在55-95%的肾细胞癌患者($n=13$)的Treg上观察到CCR8表达,平均值为72.8 \pm

12.8% (图15A)。相反, FoxP3-CD4+T效应细胞上的CCR8表达小于20% (平均 $7.9 \pm 5.6\%$), 并且针对CD8+T细胞接近于零 (平均 $1.2 \pm 0.8\%$, 图14A)。在图15B所示的直方图中, 报告了供体#726的细胞术数据, 其中Treg减少96%。CCR8被证实是在不影响RCC肿瘤内其他T细胞群的情况下消耗Treg的目标靶点。

[0342] 实施例17: 在来自健康和恶性PBMC的循环T细胞群中的CCR8表达

[0343] 如实施例15中所描述的进行CCR8表型分型。简言之, 从新鲜血液中分离来自健康 ($n=4$) 或恶性 ($n=5$) 供体的PBMC。将1/3体积的Ficoll加入血液样品中, 然后在RT下以2000rpm离心30分钟。收集含有白环的免疫细胞, 并在FACS分析之前通过在RT下以1250rpm离心10分钟用PBS洗涤两次。在T细胞群中CCR8+的百分比见图16。

[0344] 在健康或恶性患者的循环中观察到的CCR8表达针对所有T细胞群都非常低 ($<4\%$) (图16)。Treg或Teff与CD8+T细胞之间没有差异。该分析证实了仅限于肿瘤部位的靶点的特异性, 我们预计在循环中不会产生副作用, 从而限制了毒性和自身免疫的风险。

[0345] 实施例18: 在来自RCC患者的原代人肿瘤浸润淋巴细胞 (TILs) 上人源化抗CCR8抗体介导的ADCC NK杀伤活性

[0346] 图17A示出了针对离体杀死HFB101110介导的原代肿瘤浸润淋巴细胞而进行的样品收集和ADCC测定的示意图。将来自RCC患者 ($n=13$) 的肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的单细胞悬液解冻, 并在countess II装置上使用AO/PI荧光评估活力。将TIL以 $100\mu\text{L}$ /孔分装入96孔U底培养板中用于ADCC NK杀伤测定。将 $50\mu\text{L}$ 抗体添加至TIL, 然后以20:1的E/T比加入同种异体原代NK细胞。

[0347] 先前使用Miltenyi NK分离和扩增试剂盒扩增来自健康供体的NK细胞。将等分试样解冻并以 10^7 细胞/mL的温度在 37°C 的TIL培养基中储存, 直到制备TIL。实验所需的NK细胞的量是基于先前在表型分型实验期间评估的靶细胞 (Treg) 的数量来计算的。在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下共培养24小时之前, 将最终体积调节为200mL。如实施例15中所描述的进行FACS染色以鉴定免疫细胞群。使用FlowJo软件通过流式细胞术分析样品: 将B细胞门控为活+/CD45+/CD19+; 将CD8+细胞门控为活+/CD45+/CD3+/CD8+; 将Teff细胞门控为活+/CD45+/CD3+/CD4+/FoxP3-以及将Treg门控为活+/CD45+/CD3+/CD4+/FoxP3+/TIGIT+。使用单因素ANOVA测试进行统计学分析 (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)。

[0348] 与同种型组相比观察到强烈的Treg减少 (以CD3+的%计) (从50%至90%, 平均值 $71.3 \pm 13\%$, $p < 0.0001$) (图17B)。该群在图17C中的一个代表性患者的点图中消失。这种耗竭对FoxP3+CD4+T细胞 (Treg) 是特异性的, 因为如图17B中所示, 在其他细胞群上没有观察到减少。相反, 观察到CD8+细胞显著增加 (CD8+CD3+细胞), 平均值为 $+9.8 \pm 9\%$, ** $p = 0.0067$ 。此外, 治疗组的B细胞群显著增加, 为 $+16.7 \pm 19.6\%$ ($p < 0.0317$)。抗CCR8抗体能够通过特异性Treg离体耗竭来调节TME, 并通过增加RCC患者TIL中的CD8+T细胞和B细胞来恢复抗肿瘤免疫。

[0349] 如图17D中进一步所示, 在剂量应答实验中评估了以20:1的效应物:靶点比率将原代肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 与原代NK细胞共培养过夜后Treg的耗竭。通过流式细胞术对其余细胞定量。还评估了作为外源性NK细胞添加量的函数的ADCC测定中Treg的耗竭 (图17E)。九个样品中的两个即使在缺乏外源性NK细胞的情况下也显示出显著的Treg耗竭, 这表明肿瘤样品中存在的内源性NK细胞能够介导ADCC。

[0350] 实施例19:安全性和药代动力学评价

[0351] 在食蟹猴中进行HFB101110的药代动力学和安全性研究(单剂量PK研究的示意图见图18A)。

[0352] 在食蟹猴中HFB101110的血清PK性质揭示了15天后未检测到抗药抗体(见图18B),并且在使用可溶性抗体形式的人PBMC的体外细胞因子释放研究中未观察到显著的细胞因子释放(图18C)。

[0353] 参考文献

[0354] Villarreal,D.O.,L'Huillier,A.,Armington,S.,Mottershead,C.,Filippova,E.V.,Coder,B.D.,Petit,R.G.&Princiotta,M.F. (2018) Targeting CCR8 induces protective antitumor immunity and enhances vaccine-induced responses in colon cancer,Cancer Res.78,5340-5348.

[0355] Van Damme,H.,Dombrecht,B.,Kiss,M.,Roose,H.,Allen,E.,Van Overmeire,E.,Kancheva,D.,Martens,L.,Murgaski,A.,Bardet,P.M.R.,Blancke,G.,Jans,M.,Bolli,E.,Martins,M.S.,Elkrim,Y.,Dooley,J.,Boon,L.,Schwarze,J.K.,Tacke,F.,Movahedi,K.,Vandamme,N.,Neyns,B.,Ocak,S.,Scheytljens,I.,Vereecke,L.,Nana,F.A.,Merchiers,P.,Laoui,D.&Van Ginderachter,J.A. (2021) Therapeutic depletion of CCR8(+) tumor-infiltrating regulatory T cells elicits antitumor immunity and synergizes with anti-PD-1therapy,JImmunother Cancer.9,e001749.

[0356] Campbell,J.R.,McDonald,B.R.,Mesko,P.B.,Siemers,N.O.,Singh,P.B.,Selby,M.,Sproul,T.W.,Korman,A.J.,Vlach,L.M.,Houser,J.,Sambanthamoorthy,S.,Lu,K.,Hatcher,S.V.,Lohre,J.,Jain,R.&Lan,R.Y. (2021) Fc-Optimized Anti-CCR8 Antibody Depletes Regulatory T Cells in Human Tumor Models,Cancer Res.81,2983-2994.

[0357] Whiteside,S.K.,Grant,F.M.,Gyori,D.S.,Conti,A.G.,Imianowski,C.J.,Kuo,P.,Nasrallah,R.,Sadiyah,F.,Lira,S.A.,Tacke,F.,Eil,R.L.,Burton,O.T.,Dooley,J.,Liston,A.,Okkenhaug,K.,Yang,J.&Roychoudhuri,R. (2021) CCR8 marks highly suppressive Treg cells within tumours but is dispensable for their accumulation and suppressive function,Immunology.163,512-520.

[0358] Bhatt,D.,Kang,B.,Sawant,D.,Zheng,L.,Perez,K.,Huang,Z.,Sekirov,L.,Wolak,D.,Huang,J.Y.,Liu,X.,DeVoss,J.,Manzanillo,P.S.,Pierce,N.,Zhang,Z.,Symons,A.&Ouyang,W. (2021) STARTRAC analyses of scRNAseq data from tumor models reveal T cell dynamics and therapeutic targets,J Exp Med.218.e20201329.

[0359] 本领域技术人员将理解,在不脱离其广泛的发明概念的情况下,可以对上述实施方式进行修改。因此,应当理解,本发明不限于所公开的特定实施方式,而是旨在覆盖在本说明书所定义的本发明的精神和范围内的修改。

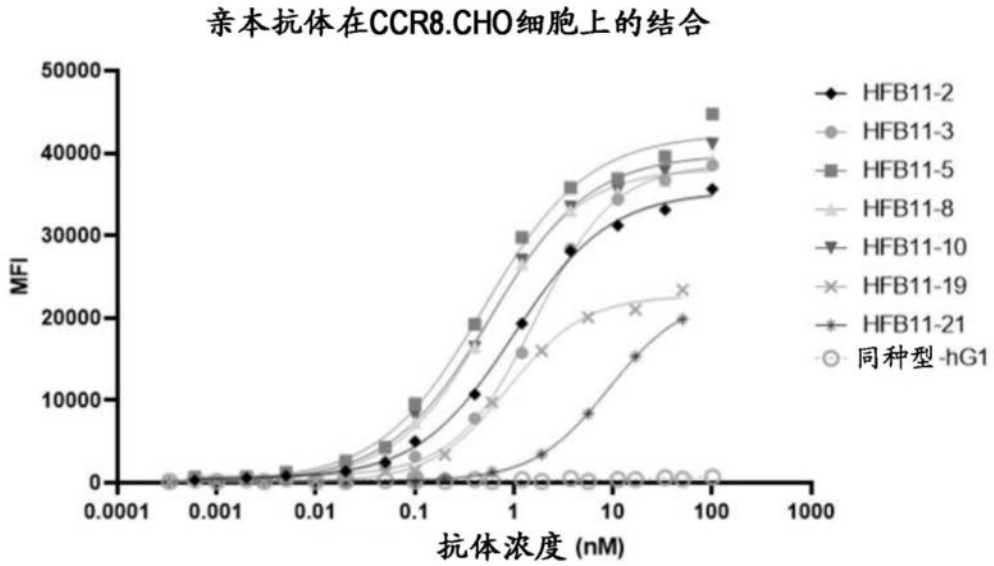


图1A

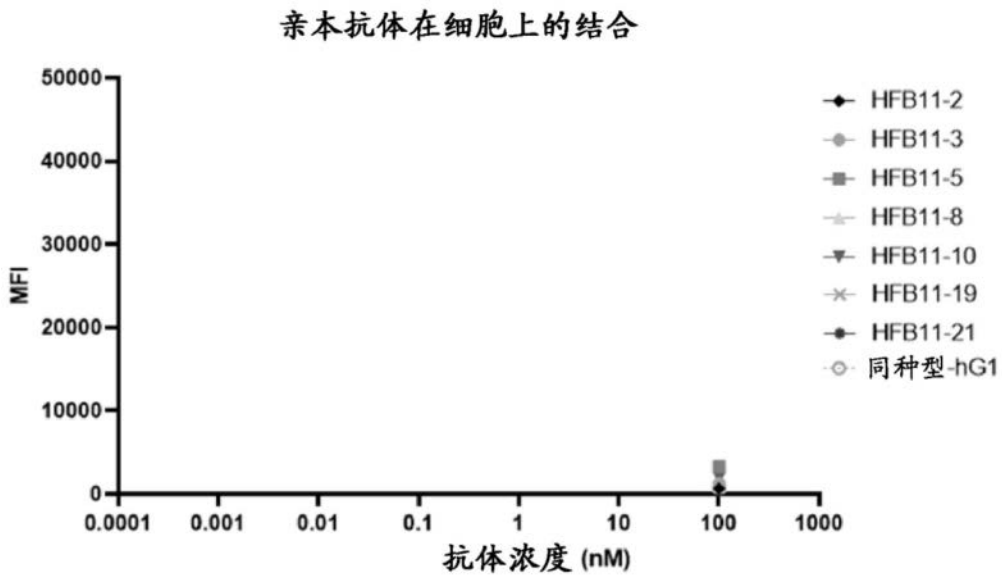


图1B

	HFB11-2	HFB11-3	HFB11-5	HFB11-8	HFB11-10	HFB11-19	HFB11-21
EC50 (nM)	0.98	1.63	0.49	0.53	0.57	0.86	9.05

图1C

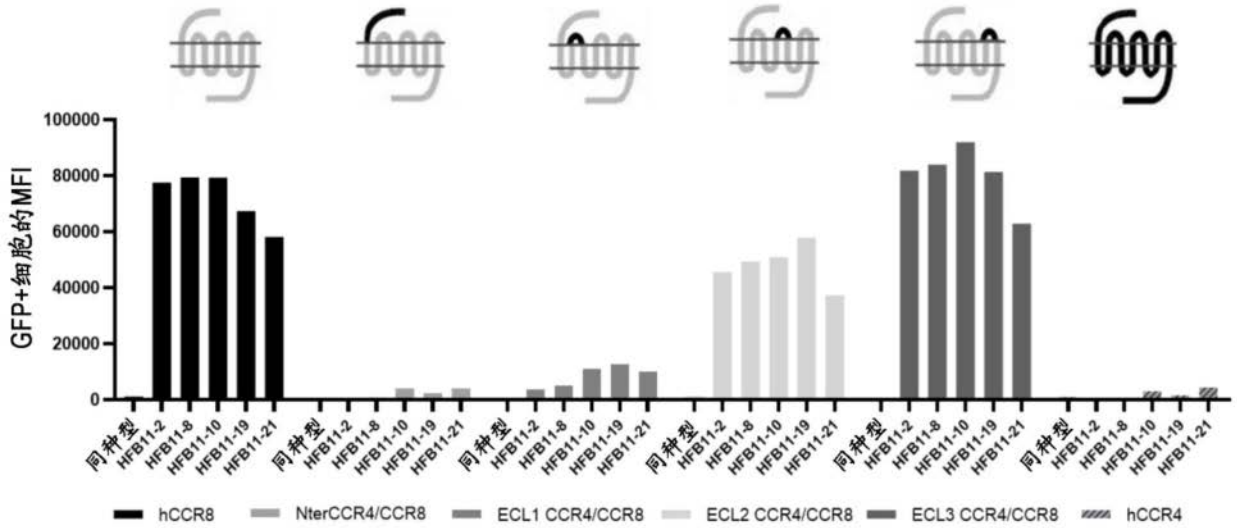


图2

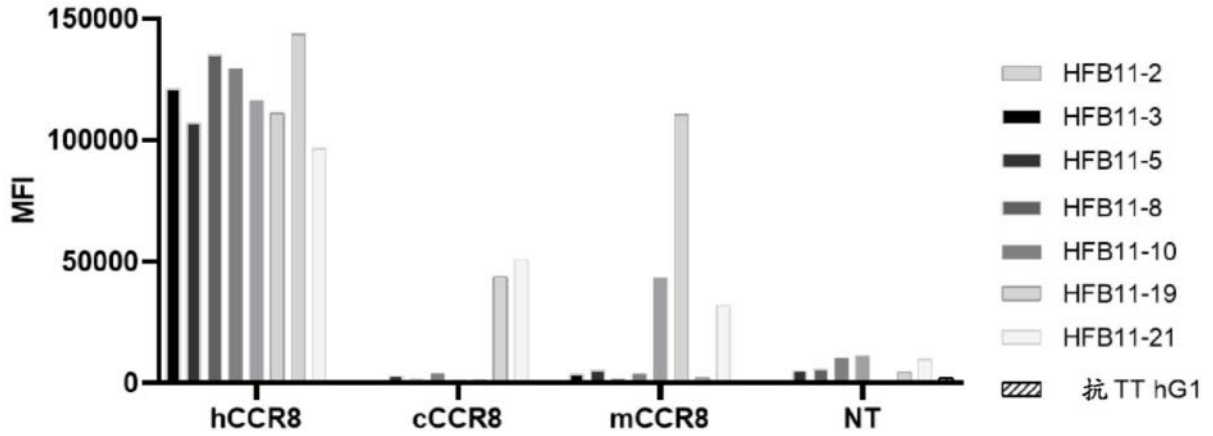


图3A

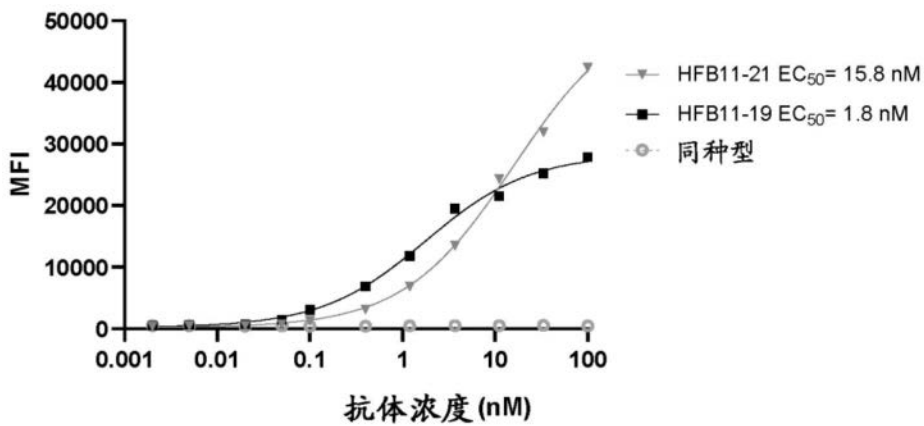


图3B

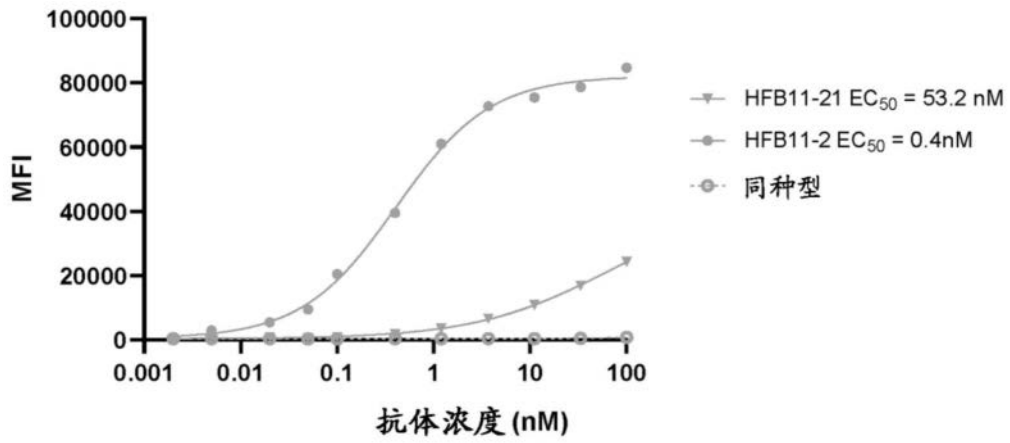


图3C

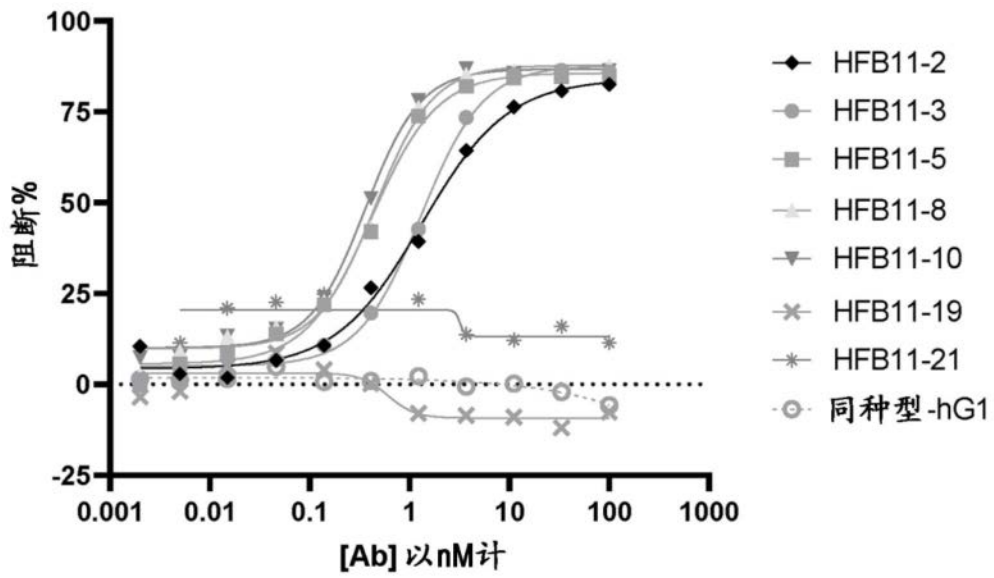


图4A

	HFB11-2	HFB11-3	HFB11-5	HFB11-8	HFB11-10	HFB11-19	HFB11-21
IC50 (nM)	1.326	1.303	0.413	0.452	0.428	n.a.	n.a.

图4B

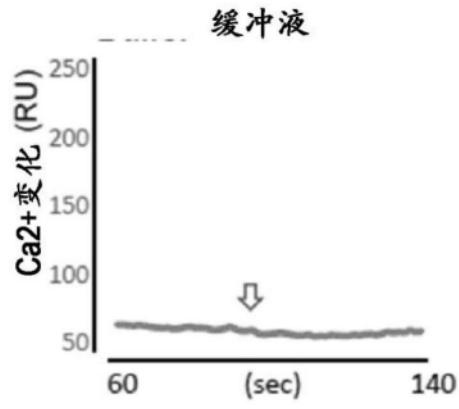


图5A

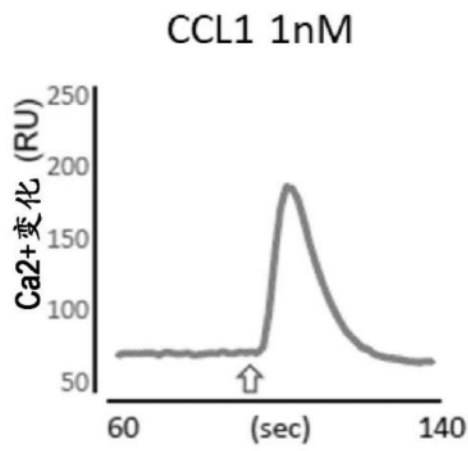


图5B

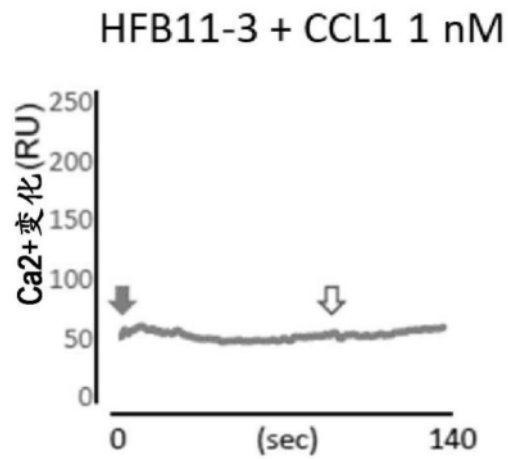


图5C

HFB11-10 + CCL1 1nM

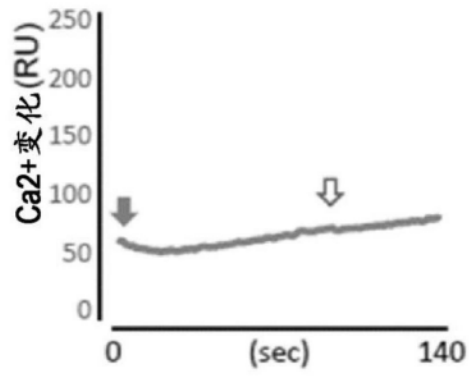


图5D

缓冲液 + CCL1 10nM

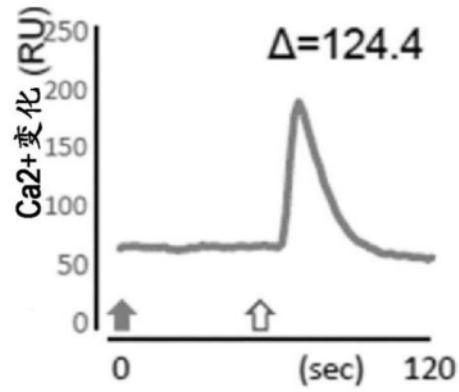


图5E

HFB11-3 + CCL1 10nM

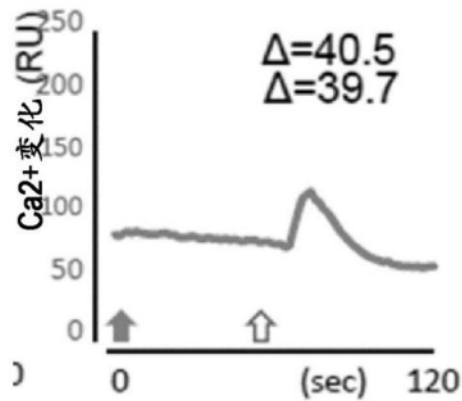


图5F

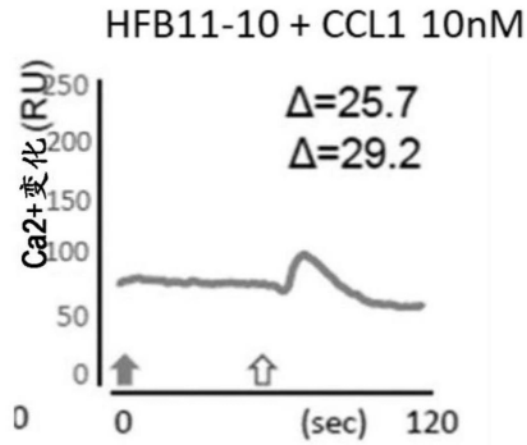


图5G

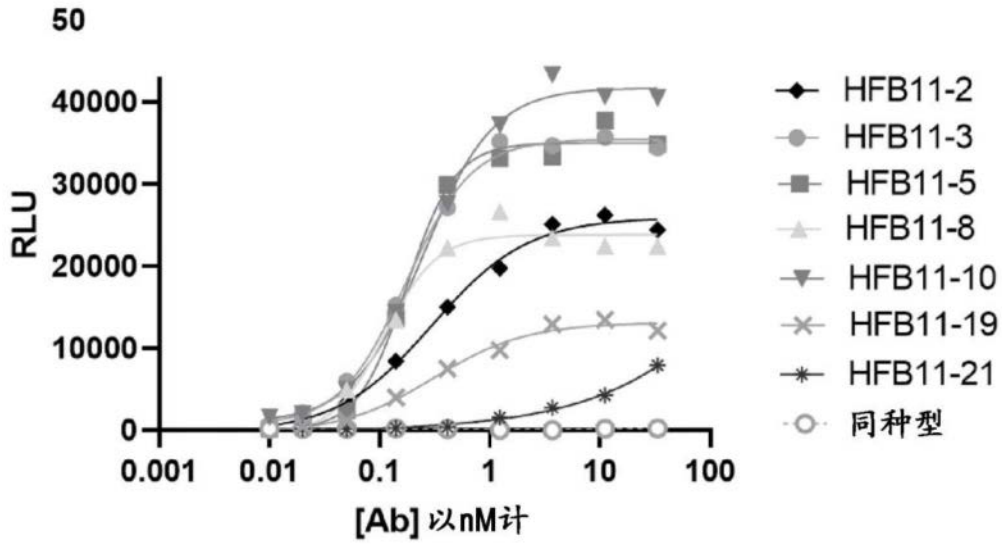


图6A

	HFB11-2	HFB11-3	HFB11-5	HFB11-8	HFB11-10	HFB11-19	HFB11-21
EC50 (nM)	0.297	0.173	0.175	0.110	0.246	0.305	n.a.
E_{max}	25953	35481	35027	23836	41723	13130	n.a.

图6B

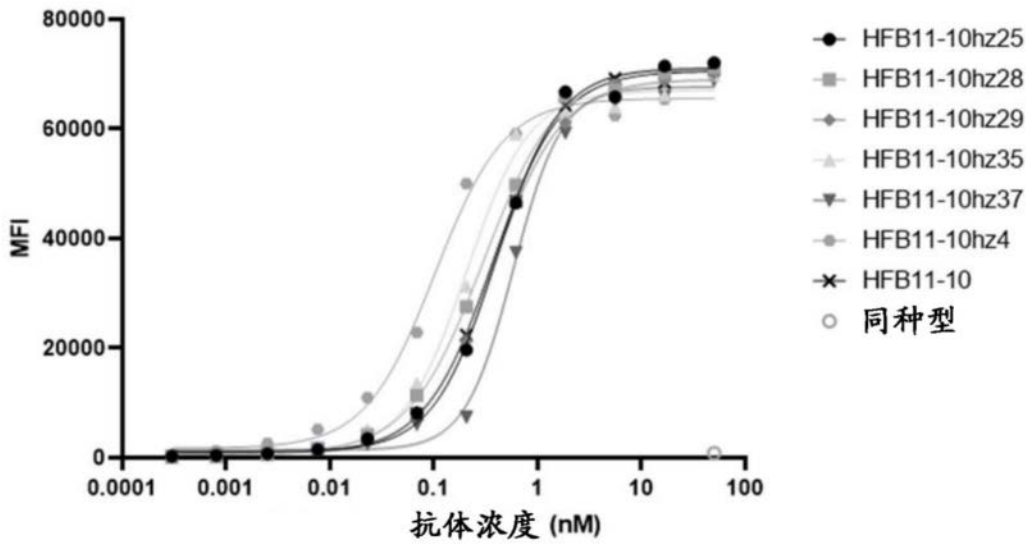


图7A

	HFB11-10hz25	HFB11-10hz28	HFB11-10hz29	HFB11-10hz35	HFB11-10hz37	HFB11-10hz4	HFB11-10
EC50 (nM)	0.40	0.30	0.37	0.21	0.58	0.10	0.37

图7B

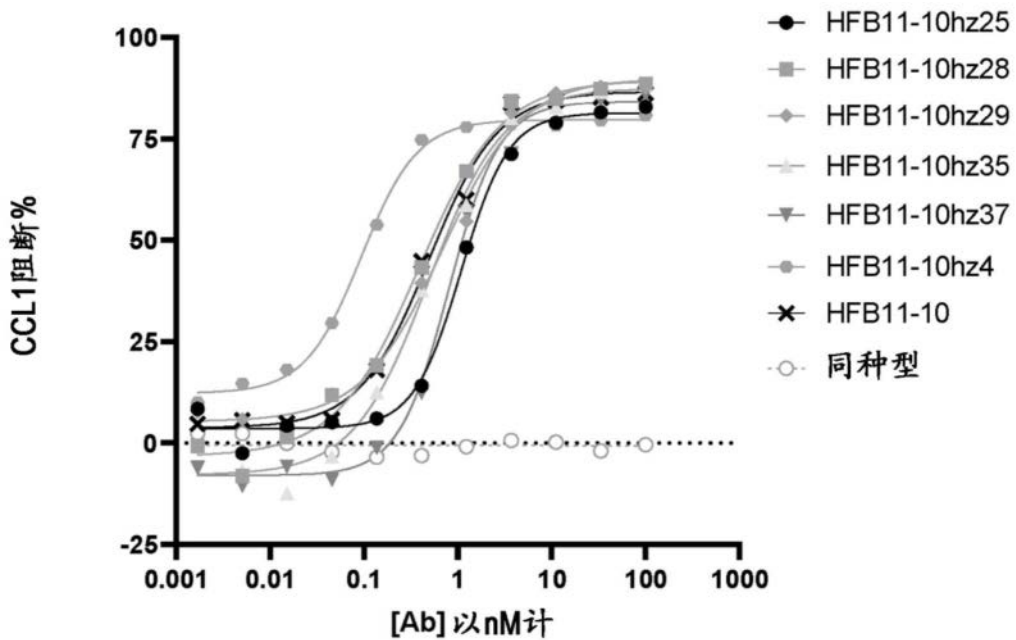


图8A

	HFB11-10hz25	HFB11-10hz28	HFB11-10hz29	HFB11-10hz35	HFB11-10hz37	HFB11-10hz4	HFB11-10
IC50 (nM)	1.091	0.385	0.683	0.488	0.808	0.094	0.428

图8B

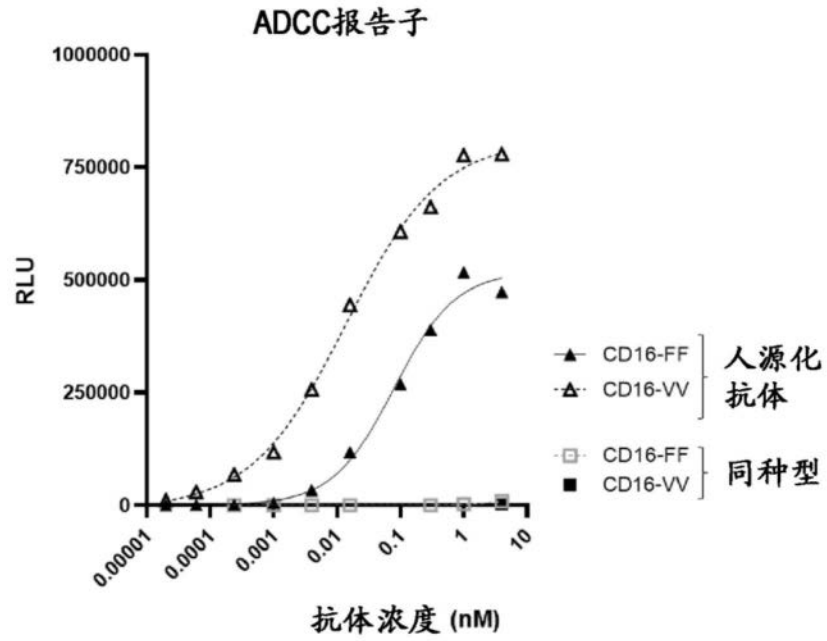


图9

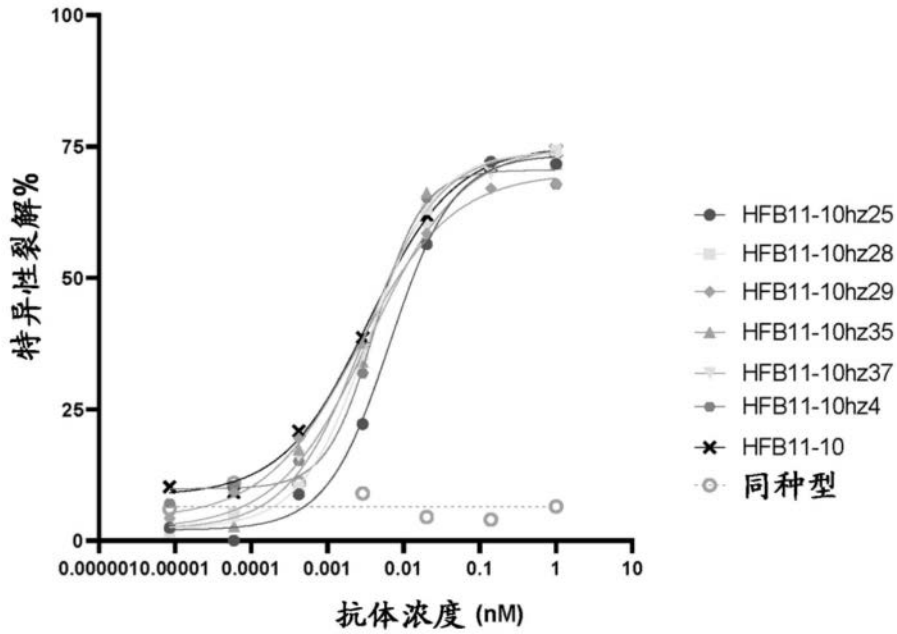


图10A

	HFB11-10hz25	HFB11-10hz28	HFB11-10hz29	HFB11-10hz35	HFB11-10hz37	HFB11-10hz4	HFB11-10
EC50 (nM)	0.007	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.003

图10B

A

与高拷贝和低拷贝 CCR8+ 细胞的结合

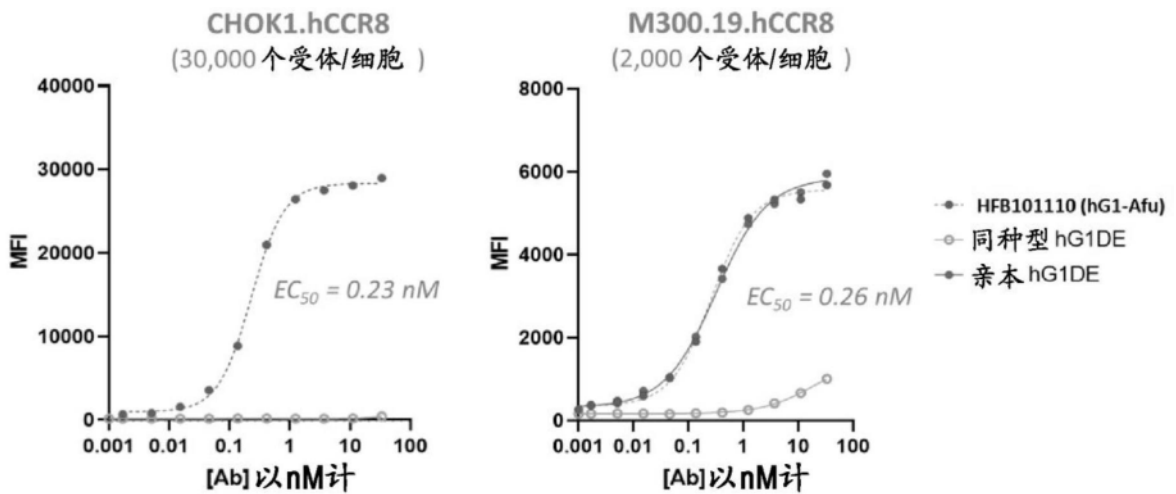


图11A

B

针对低拷贝
(~2,000个受体/细胞) M300.19-hCCR8细胞的ADCC活性

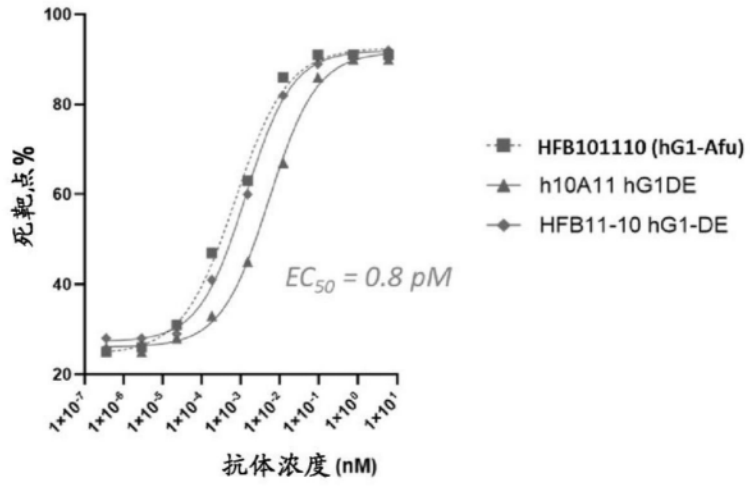


图11B

C

特异性针对hCCR8而非hCCR4

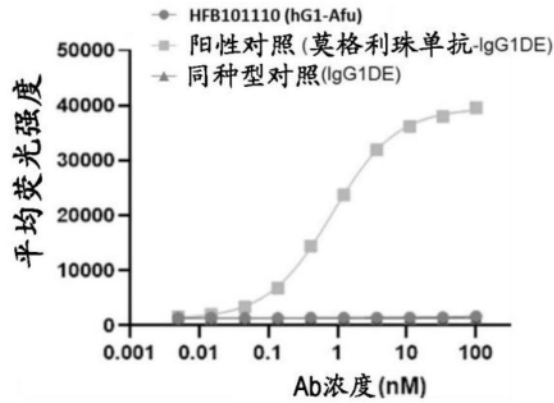


图11C

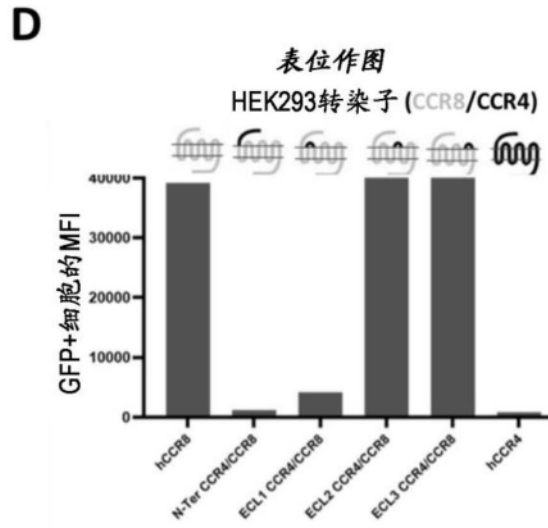


图11D

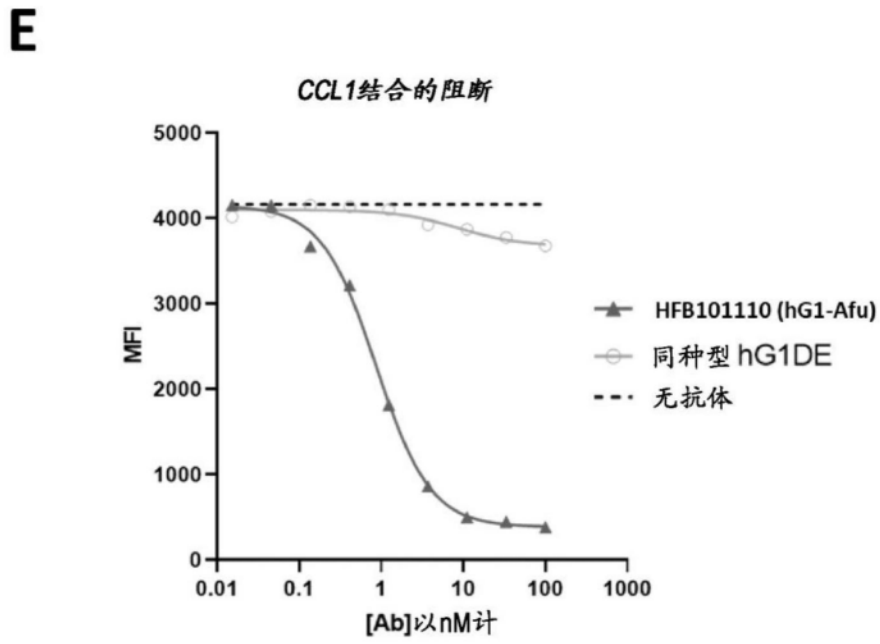


图11E

F

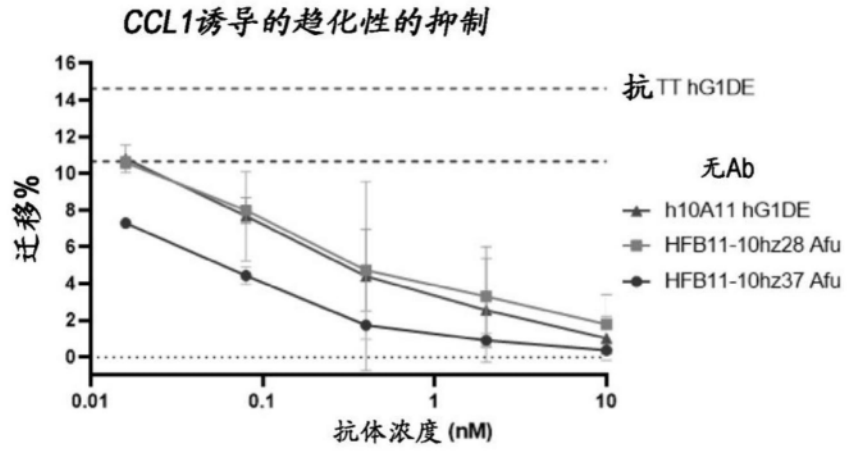


图11F

G

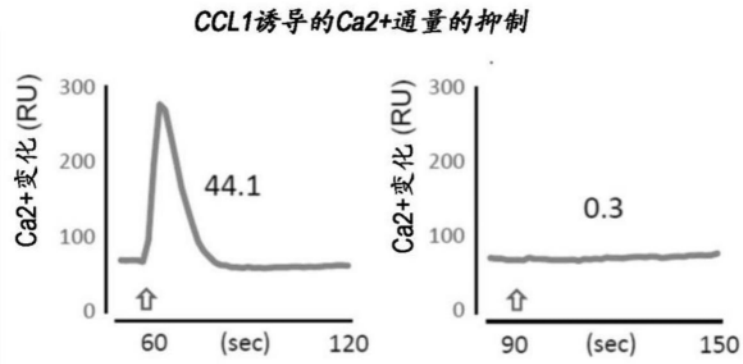


图11G

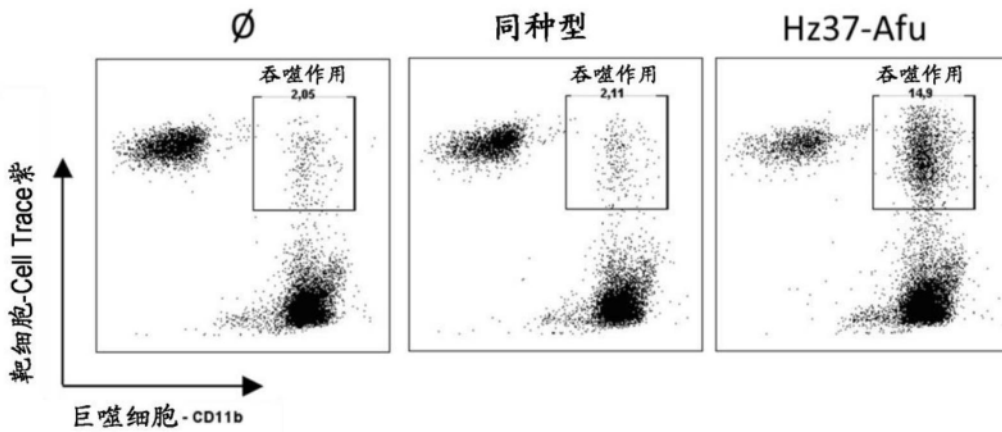


图12

A

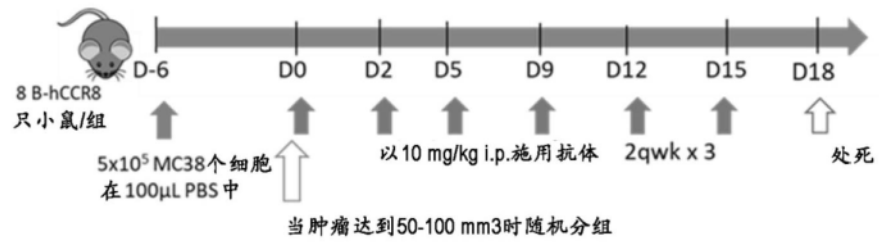


图13A

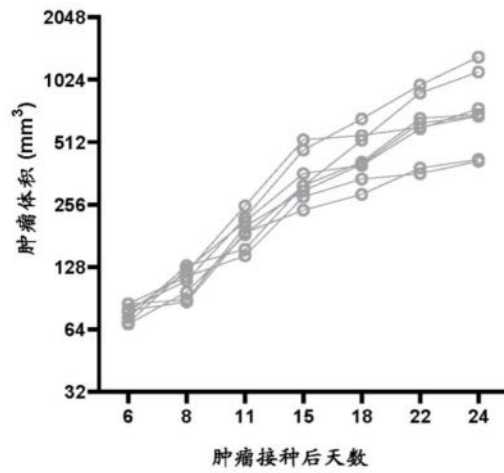


图13B

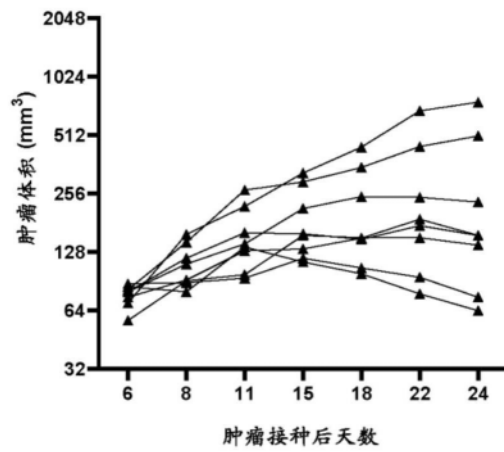


图13C

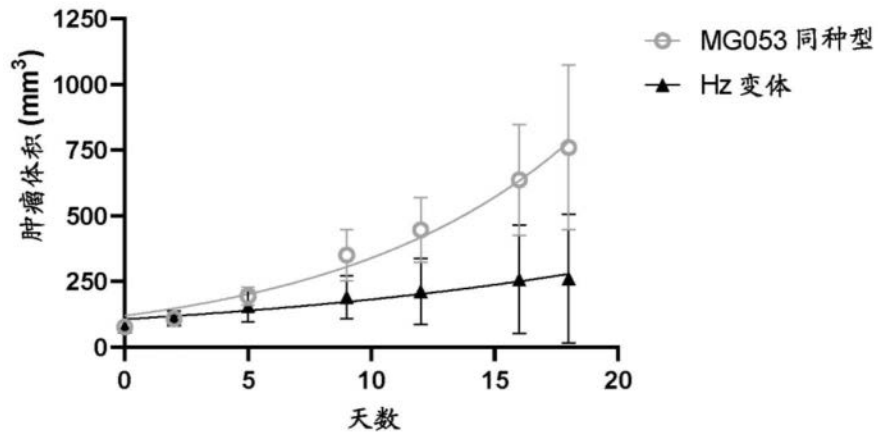


图13D

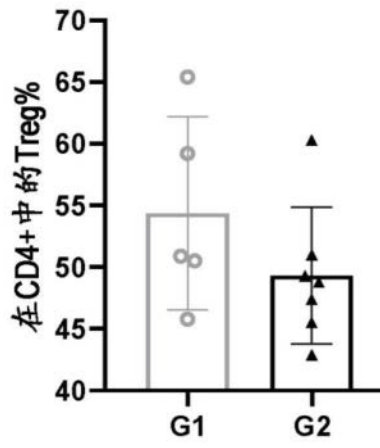


图14A

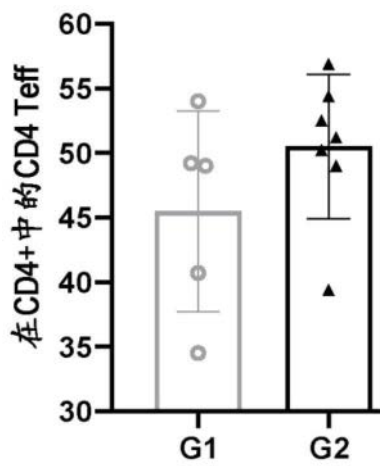


图14B

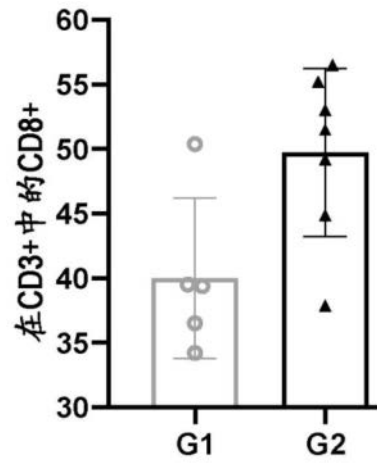


图14C

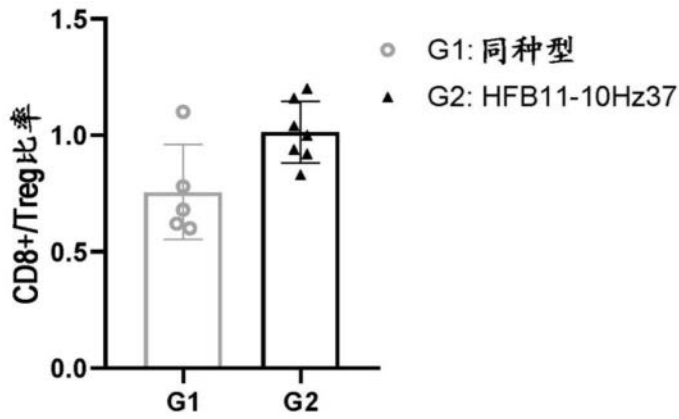


图14D

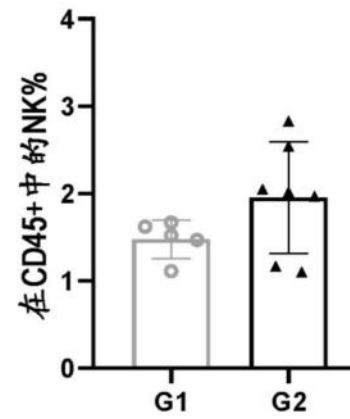


图14E

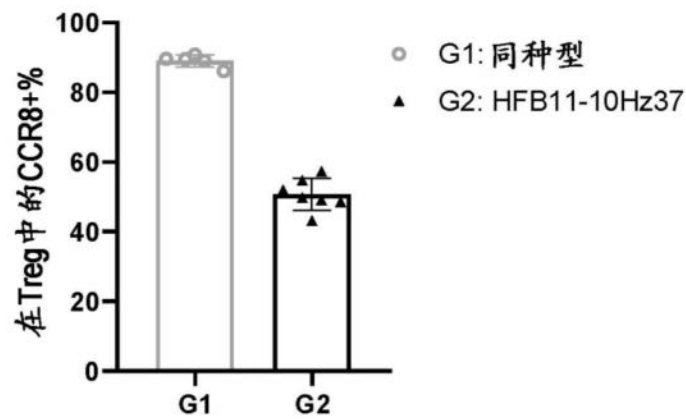


图14F

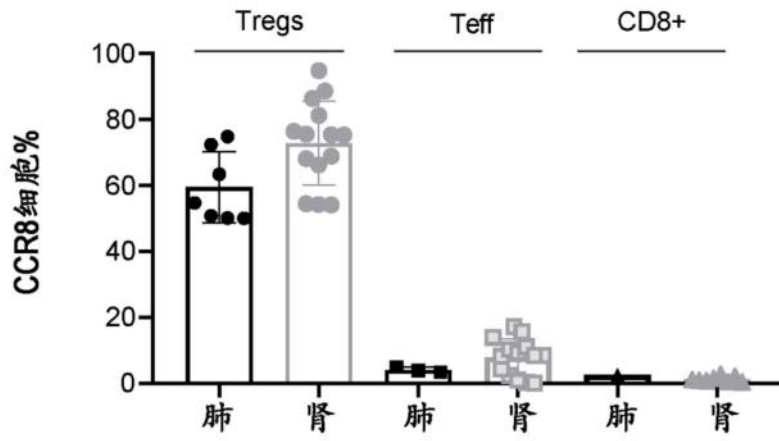


图15A

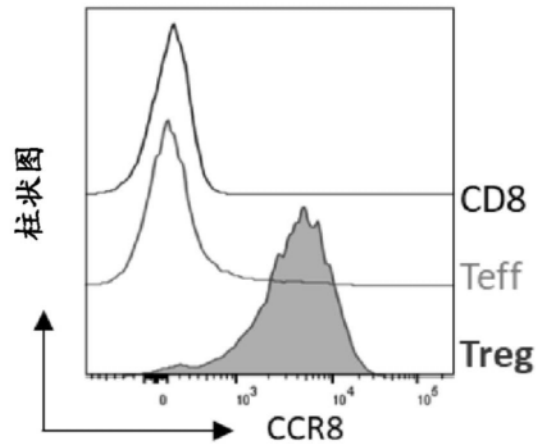


图15B

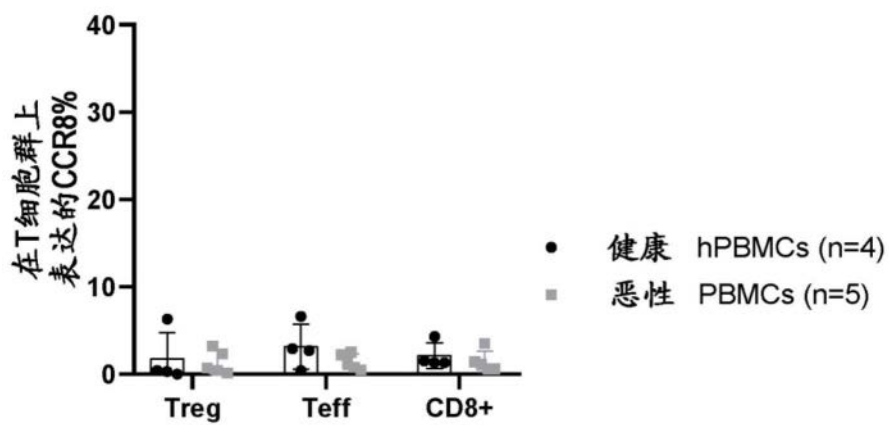


图16

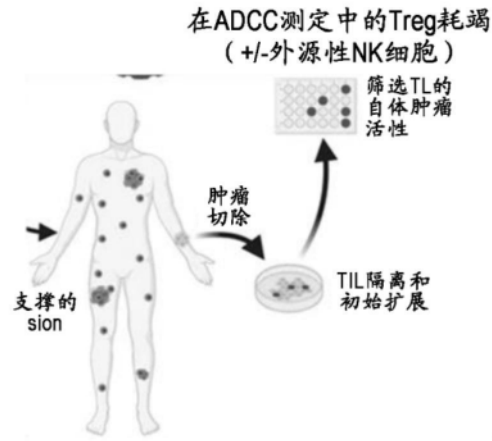


图17A

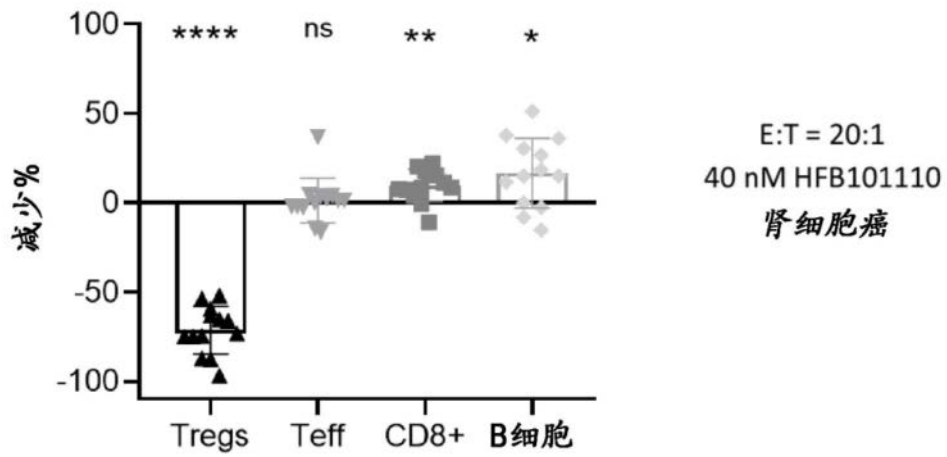


图17B

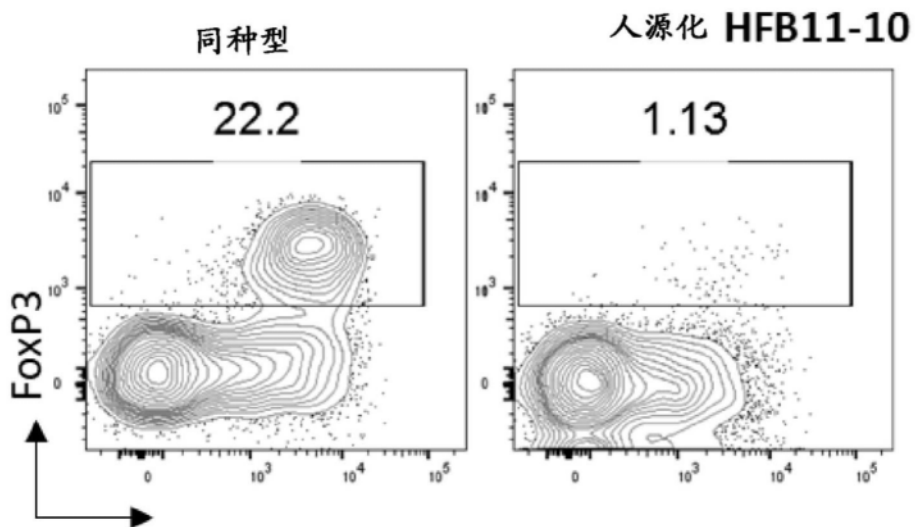


图17C

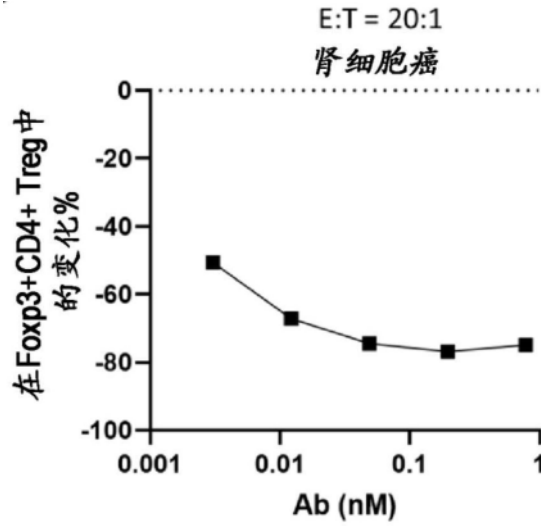


图17D

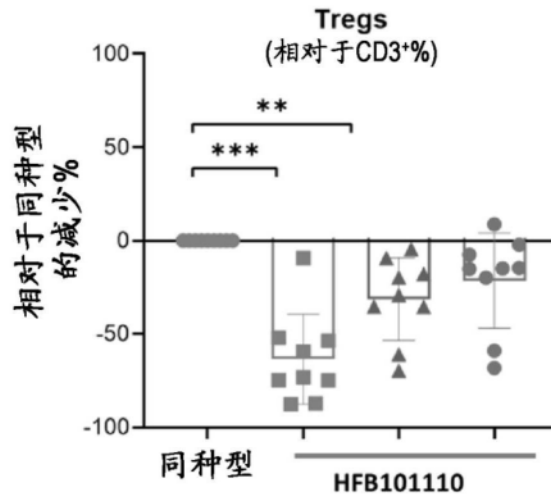


图17E

A

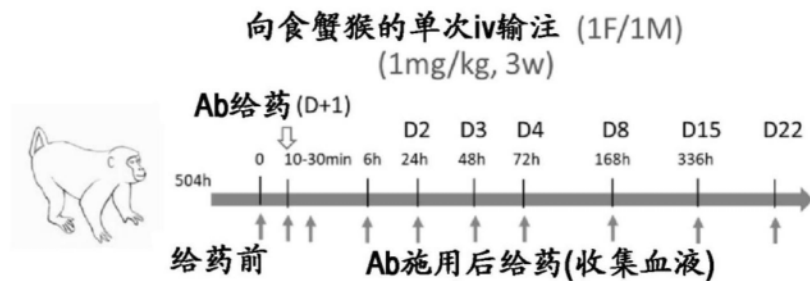


图18A

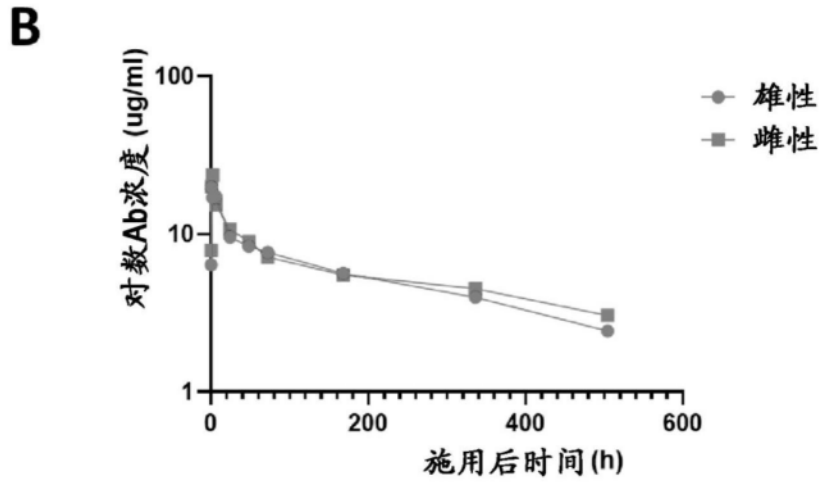


图18B

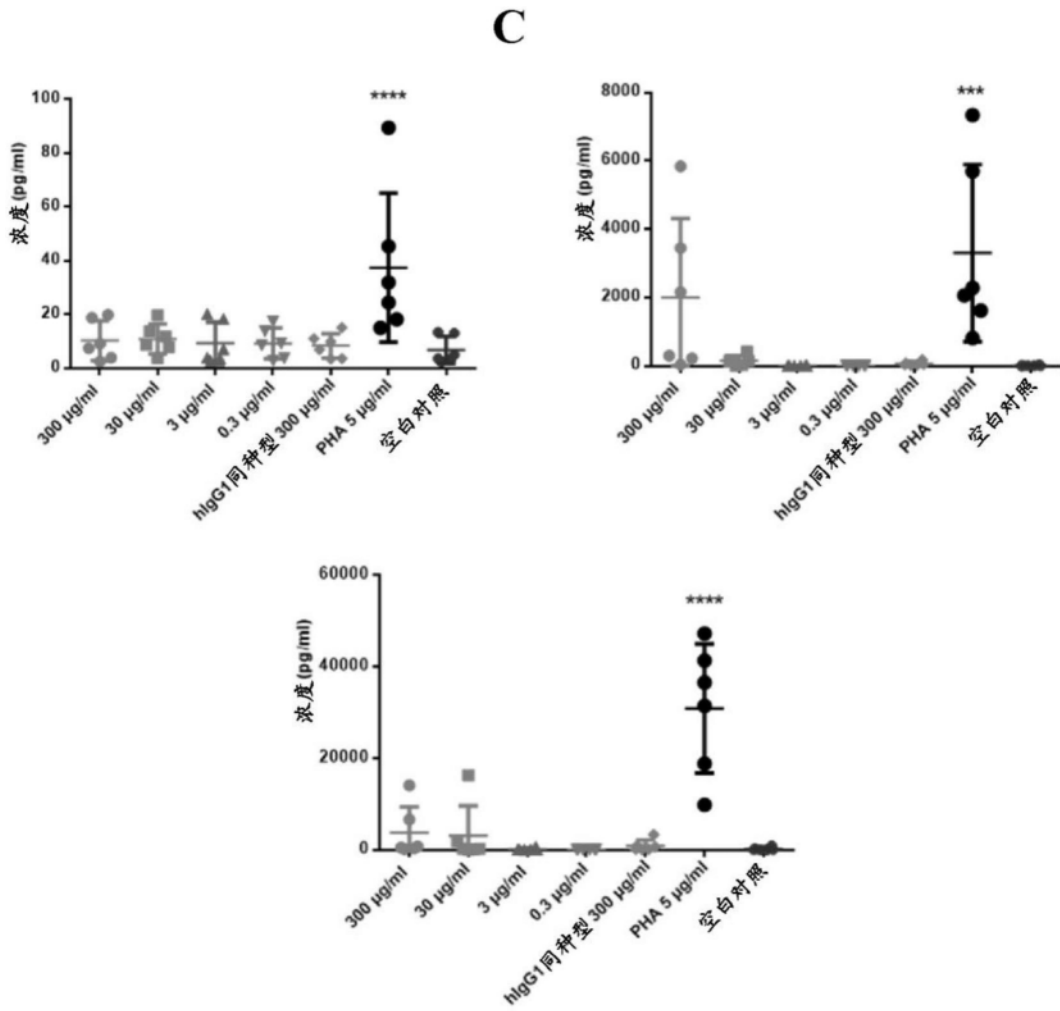


图18C