(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120051493 A
(43)申请公布日 2025.05.27

(21)申请号 202380073161.0
(22)申请日 2023.08.18
(30)优先权数据
63/399,483 2022.08.19 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.04.16
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/072462 2023.08.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/040216 EN 2024.02.22
(71)申请人 菲布罗根有限公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 D·T·布鲁索 G·沃金肖 C·维奇
(74)专利代理机构 北京市汉坤律师事务所 11602
专利代理师 彭柯峥 李英
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 14/715(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

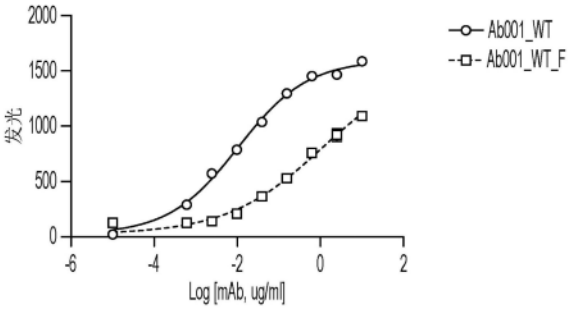
权利要求书4页 说明书36页
序列表（电子公布） 附图7页

(54)发明名称

抗CCR8抗体及其用途

(57)摘要

本文提供了分离的单克隆抗体抗CCR8抗体、其抗原结合片段、其突变体、其变体及其用于治疗如癌症的疾病的用途。突变体抗体具有经修饰以消除翻译后修饰并改善抗体的稳定性和效力的互补决定区3。变体抗体具有不同水平的去岩藻糖基化。本文还提供了使用抗CCR8抗体的方法，包括治疗癌症的方法。还提供了编码本文所述的重链或轻链或其抗原结合部分的多核苷酸，以及包括本文所述的多核苷酸的载体、尤其是表达载体。



CN 120051493 A

1.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,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(HCVR),所述重链可变区包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR互补决定区(CDR1)序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSEQQYYYAMDY(SEQ ID NO:19)的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8。

2.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:HC,所述HC包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,所述LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列。

3.如权利要求2所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:所述重链可变区(HCVR)序列是SEQ ID NO:36和/或所述轻链可变区(LCVR)序列是SEQ ID NO:32。

4.如权利要求2或3所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:所述HCVR序列是SEQ ID NO:36并且所述LCVR序列是SEQ ID NO:32。

5.如权利要求2、3或4所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:所述HC序列是SEQ ID NO:6并且所述LC序列是SEQ ID NO:2。

6.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

(a)重链可变区(HCVR),所述重链可变区包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSEQNYYYAMDY(SEQ ID NO:16)的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或

(b)重链可变区(HCVR),所述重链可变区包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSENNYYYAMDY(SEQ ID NO:17)的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或

(c)重链可变区(HCVR),所述重链可变区包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSENQYYYAMDY(SEQ ID NO:18)的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或

(d)重链可变区(HCVR),所述重链可变区包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:

10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSDQNYYYAMDY(SEQ ID NO:20)的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或

(e)重链可变区(HCVR),所述重链可变区包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSDNQYYYAMDY(SEQ ID NO:21)的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或

(f)重链可变区(HCVR),所述重链可变区包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSDQQYYYAMDY(SEQ ID NO:22)的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列,

其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8。

7.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

(a)重链(HC),所述重链包含与SEQ ID NO:3具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及轻链(LC),所述轻链包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;

(b)HC,所述HC包含与SEQ ID NO:4具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,所述LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;

(c)HC,所述HC包含与SEQ ID NO:5具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,所述LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;

(d)HC,所述HC包含与SEQ ID NO:7具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,所述LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;

(e)HC,所述HC包含与SEQ ID NO:8具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,所述LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;或

(f)HC,所述HC包含与SEQ ID NO:9具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,所述LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列,

其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8。

8.如权利要求6所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:

(a)所述HCVR序列是SEQ ID NO:33和/或所述LCVR序列是SEQ ID NO:32,

(b)所述HCVR序列是SEQ ID NO:34和/或所述LCVR序列是SEQ ID NO:32,

(c)所述HCVR序列是SEQ ID NO:35和/或所述LCVR序列是SEQ ID NO:32,

(d)所述HCVR序列是SEQ ID NO:37和/或所述LCVR序列是SEQ ID NO:32,

(e)所述HCVR序列是SEQ ID NO:38和/或所述LCVR序列是SEQ ID NO:32,

(f)所述HCVR序列是SEQ ID NO:39和/或所述LCVR序列是SEQ ID NO:32。

9.如权利要求6或8所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:

(a)所述HCVR序列是SEQ ID NO:33并且所述LCVR序列是SEQ ID NO:32,

(b)所述HCVR序列是SEQ ID NO:34并且所述LCVR序列是SEQ ID NO:32,

(c)所述HCVR序列是SEQ ID NO:35并且所述LCVR序列是SEQ ID NO:32,

(d)所述HCVR序列是SEQ ID NO:37并且所述LCVR序列是SEQ ID NO:32,

(e)所述HCVR序列是SEQ ID NO:38并且所述LCVR序列是SEQ ID NO:32,

(f)所述HCVR序列是SEQ ID NO:39并且所述LCVR序列是SEQ ID NO:32。

10.如权利要求6、8或9所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:

所述HC序列是SEQ ID NO:3并且所述LC序列是SEQ ID NO:2,

所述HC序列是SEQ ID NO:4并且所述LC序列是SEQ ID NO:2,

所述HC序列是SEQ ID NO:5并且所述LC序列是SEQ ID NO:2,

所述HC序列是SEQ ID NO:7并且所述LC序列是SEQ ID NO:2,

所述HC序列是SEQ ID NO:8并且所述LC序列是SEQ ID NO:2,或

所述HC序列是SEQ ID NO:9并且所述LC序列是SEQ ID NO:2。

11.如权利要求1-10中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是人源化抗体。

12.如权利要求1-11中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述其抗原结合片段是Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、单链Fv或scFv、二硫键连接的F_v、V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、$IgGACH_2$、微型抗体、$F(ab')_3$、四抗体、三抗体、双抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

13.如权利要求1-12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以小于约25nM、20nM、15nM、10nM、5nM、2nM、1nM、0.5nM或0.01nM的K_d结合人CCR8。

14.如权利要求1-13中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段诱导抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

15.如权利要求1-14中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体具有至少50%的去岩藻糖基化水平。

16.如权利要求1-15中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体具有至少85%的去岩藻糖基化水平。

17.一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包含向所述受试者施用有效量的如权利要求1-16中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,从而治疗所述受试者的癌症。

18.如权利要求17所述的方法,其中所述癌症是血液癌症或实体瘤。

19.如权利要求18所述的方法,其中所述血液癌症选自由以下构成的组:急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、毛细胞白血病、艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样肉芽肿病、非霍奇金淋巴瘤、原发中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)以及多发性骨髓瘤。

20.如权利要求18所述的方法,其中所述实体瘤是乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结肠癌、肾癌、卵巢癌、肝癌或前列腺癌。

21.如权利要求17-20中任一项所述的方法,所述方法进一步包括向所述患者施用化学治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂、检查点抑制剂和/或抗肿瘤组合物。

22.一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段具有HCVR,所述HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSEQQYYYAMDY(SEQ ID NO:19)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,所述LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列,从而治疗所述受试者的癌症。

23.如权利要求22所述的方法,其中所述癌症是实体瘤。

24.如权利要求23所述的方法,其中所述实体瘤选自由以下构成的组:乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结直肠癌、肾癌、尿路上皮癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、胃癌、胃食管癌、食管癌、宫颈癌、鳞状细胞癌、前列腺癌或膀胱癌。

25.如权利要求22-24中任一项所述的方法,所述方法进一步包括向所述患者施用化学治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂、检查点抑制剂和/或抗肿瘤组合物。

26.一种多核苷酸,所述多核苷酸编码如权利要求1-16中任一项所述的重链或轻链或其抗原结合部分。

27.一种载体,所述载体包含如权利要求26所述的多核苷酸,其中所述载体是选自由以下构成的组的表达载体:哺乳动物表达载体、酵母表达载体、昆虫表达载体以及细菌表达载体。

抗CCR8抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C.§119(e)要求2022年8月19日提交的美国临时申请号63/399,483的优先权的权益。在先申请的公开内容被认为是本申请的公开内容的一部分,并且将在先申请的公开内容通过援引以其全文并入本申请的公开内容。

[0003] 序列表的并入

[0004] 将所附序列表中的材料通过援引特此并入本申请。所附的名称为148640-004502_SL.xml的序列表xml文件创建于2023年8月18日,并且为39,844字节。

发明内容

[0005] 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、编码抗体的核酸和表达载体、含有载体的重组细胞以及包含抗体的组合物。还提供了制备抗体的方法以及使用抗体治疗疾病(包括癌症和/或相关并发症)的方法。

[0006] CCR8是在CCL1或CCL18梯度下介导细胞迁移的趋化因子受体(Islam等人,JEM[实验医学杂志]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记物,与循环中的Treg相比,其在存在于肿瘤内的Treg中的表达显著更高,并且在其他T细胞群(分别为细胞毒性T细胞或效应T细胞)上不表达或表达非常低。此外,CCR8主要在表达FoxP3高、CD25高、TIGIT+、LAG3+并且释放高IL-10和TGF-β的高免疫抑制性Treg上表达。耗尽CCR8+Treg将降低免疫抑制性细胞因子,并且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,CCR8+Treg数量高与疾病的更晚期相关,并且可能降低总生存期。因此,CCR8是治疗和潜在治愈CCR8阳性的癌症的理想癌症免疫疗法靶点。

[0007] 本文所述的本发明的方面涉及针对CCR8的人源化抗体、其突变体和其变体及其用于治疗如癌症等疾病的用途。

[0008] 在一个实施方案中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSEQQYYYAMDY(SEQ ID NO:19)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8。在其中的特定实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:36的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR。在其中的一个特定实施方案中,抗体是Ab001_M4,并且包含SEQ ID NO:6的重链和SEQ ID NO:2的轻链。

[0009] 在另一个实施方案中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包括:HC,该HC包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,该LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列。

[0010] 在另一个实施方案中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(a)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSEQNYYYAMDY(SEQ ID NO:16)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(b)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSENNYYYAMDY(SEQ ID NO:17)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(c)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSENQYYYAMDY(SEQ ID NO:18)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(d)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSDQNYYYAMDY(SEQ ID NO:20)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(e)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSDNQYYYAMDY(SEQ ID NO:21)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(f)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSDQQYYYAMDY(SEQ ID NO:22)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8。在其中的特定实施方案中,抗体包含(a)SEQ ID NO:33的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR,(b)SEQ ID NO:34的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR,(c)SEQ ID NO:35的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR,(d)SEQ ID NO:37的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR,(e)SEQ ID NO:38的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR,或(f)SEQ ID NO:39的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR。在其中的一个特定实施方案中,抗体是(a)Ab001_M1并且包含SEQ ID NO:3的重链和SEQ ID NO:2的轻链,(b)Ab001_M2并且包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:2的轻链,(c)Ab001_M3并且包含SEQ ID NO:5的重链和SEQ ID NO:2的轻链,(d)Ab001_M5并且包含SEQ ID NO:7的重链和SEQ ID NO:2的轻链,(e)Ab001_M6并且包含SEQ ID NO:8的重链和SEQ ID NO:2的轻链,或(f)Ab001_M7并且包含

SEQ ID NO:9的重链和SEQ ID NO:2的轻链。

[0011] 在另一个实施方案中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包括:(a)HC,该HC包含与SEQ ID NO:3具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,该LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;(b)HC,该HC包含与SEQ ID NO:4具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,该LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;(c)HC,该HC包含与SEQ ID NO:5具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,该LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;(d)HC,该HC包含与SEQ ID NO:7具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,该LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;(e)HC,该HC包含与SEQ ID NO:8具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,该LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;或(f)HC,该HC包含与SEQ ID NO:9具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,该LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8。

[0012] 在一方面,HCVR序列是SEQ ID NO:33和/或LCVR序列是SEQ ID NO:32,HCVR序列是SEQ ID NO:34和/或LCVR序列是SEQ ID NO:32,HCVR序列是SEQ ID NO:35和/或LCVR序列是SEQ ID NO:32,HCVR序列是SEQ ID NO:37和/或LCVR序列是SEQ ID NO:32,HCVR序列是SEQ ID NO:38和/或LCVR序列是SEQ ID NO:32,或HCVR序列是SEQ ID NO:39和/或LCVR序列是SEQ ID NO:32。在一些方面,HCVR序列是SEQ ID NO:33并且LCVR序列是SEQ ID NO:32,HCVR序列是SEQ ID NO:34并且LCVR序列是SEQ ID NO:32,HCVR序列是SEQ ID NO:35并且LCVR序列是SEQ ID NO:32,HCVR序列是SEQ ID NO:37并且LCVR序列是SEQ ID NO:32,HCVR序列是SEQ ID NO:38并且LCVR序列是SEQ ID NO:32,或HCVR序列是SEQ ID NO:39并且LCVR序列是SEQ ID NO:32。

[0013] 在另一方面,本发明提供了分离的单克隆抗体,该分离的单克隆抗体包括:(a)包含SEQ ID NO:3的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链;(b)包含SEQ ID NO:4的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链;(c)包含SEQ ID NO:5的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链;(d)包含SEQ ID NO:7的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链;(e)包含SEQ ID NO:8的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链;(f)包含SEQ ID NO:9的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链,其中抗体特异性结合CCR8。

[0014] 在另一方面,抗体是人源化抗体。在一方面,其抗原结合片段是Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、单链Fv或scFv、二硫键连接的F_v、V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、$IgGACH_2$、微型抗体、$F(ab')_3$、四抗体、三抗体、双抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。在其他方面,单克隆抗体或其抗原结合片段以小于约25nM、20nM、15nM、10nM、5nM、2nM、1nM、0.5nM或0.01nM的K_d结合人CCR8。在一方面,抗体诱导抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在另一方面,抗体具有至少50%的去岩藻糖基化(afucosylation)水平。在各个方面,抗体具有至少85%的去岩藻糖基化水平。

[0015] 在另一个实施方案中,本发明提供了治疗有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段中的任一种,从而治疗受试者的癌症。

[0016] 在另一个实施方案中,本发明提供了治疗有需要的受试者的癌症的方法,该方法包含向受试者施用有效量的如本文所提供的至少一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段。在一方面,该方法包含施用抗体,该抗体具有HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSEQQYYYAMDY(SEQ ID NO:19)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列,从而治疗受试者的癌症。在其中的特定实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:36的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR。在其中的一个特定实施方案中,抗体是Ab001_M4,并且包含SEQ ID NO:6的重链和SEQ ID NO:2的轻链。

[0017] 在一方面,癌症是血液癌症。在一些方面,血液癌症选自由以下构成的组:急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、毛细胞白血病、艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样肉芽肿病、非霍奇金淋巴瘤、原发中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)以及多发性骨髓瘤。

[0018] 在另一方面,癌症是实体瘤。在一些方面,实体瘤选自由以下构成的组:乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结直肠癌、肾癌、尿路上皮癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、胃癌、胃食管癌、食管癌、宫颈癌、鳞状细胞癌、前列腺癌或膀胱癌。在一方面,所述方法进一步包括向患者施用化学治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂、检查点抑制剂和/或抗肿瘤组合物。

[0019] 在另外的实施方案中,本发明提供了多核苷酸,该多核苷酸编码本文所述的抗体或其抗原结合片段中的任一种的重链或轻链或其抗原结合部分。

[0020] 在一个实施方案中,本发明提供了载体,该载体包括本文所述的多核苷酸,其中载体是选自由以下构成的组的表达载体:哺乳动物表达载体、酵母表达载体、昆虫表达载体以及细菌表达载体。

附图说明

[0021] 图1是图示具有不同水平的去岩藻糖基化的抗体的ADCC效力的图。

[0022] 图2A-图2C图示了Ab001_Wt抗体的脱氨基。图2A图示了采用CHO-hCCR8细胞的结合测定结果。图2B图示了ADCC报告物测定结果。图2C图示了肽图分析结果。

[0023] 图3A-图3B图示了Ab001_Wt抗体随时间的活性。图3A图示了随时间的结合测定结果。图3B图示了随时间的ADCC报告物测定结果。

[0024] 图4A-图4C图示了与Ab001_Wt相比Ab001_M1-M4的采用CHO.hCCR8细胞的结合测定结果。图4A图示了与Ab001_Wt相比Ab001_M1和Ab001_M2的结合测定结果。图4B图示了与Ab001_Wt相比Ab001_M3和Ab001_M4的结合测定结果。图4C是示出了在图4A和图4B中计算的EC50的表格。

[0025] 图5A-图5C图示了与Ab001_Wt相比Ab001_M1-M4的用CHO.hCCR8作为靶细胞获得的ADCC报告物测定结果。图5A图示了与Ab001_Wt相比Ab001_M1和Ab001_M2的ADCC报告物测定结果。图5B图示了与Ab001_Wt相比Ab001_M3和Ab001_M4的ADCC报告物测定结果。图5C是示

出了在图5A和图5B中计算的EC50的表格。

具体实施方式

[0026] 本文所述的本发明的方面涉及针对CCR8的人源化抗体及其用于治疗如癌症等疾病的用途。

[0027] 在描述本发明的组合物和方法之前,应理解,本发明不限于所描述的具体组合物、方法和实验条件,因为这样的组合物、方法和条件可以变化。还应理解,本文所用的术语仅用于描述具体实施方案的目的,并不旨在是限制性的,因为本发明的范围将仅在所附权利要求中限定。

[0028] 除非上下文另外清楚地规定,否则如本说明书和所附权利要求所用,单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述/该/这些(the)”包括复数指示物。因此,例如,对“所述/该方法”的提及包括一种或多种方法和/或在阅读本公开之后对于本领域技术人员而言将变得清楚的本文所述的类型的步骤等。

[0029] 将本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都通过援引并入本文,并入程度就像每个单独的出版物、专利或专利申请被明确且单独地指出通过援引并入一样。

[0030] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管与本文所述的那些方法和材料类似或等同的任何方法和材料都可以用于本发明的实践或测试,但将理解,修改和变化涵盖在本公开的精神和范围内。现在描述优选的方法和材料。

[0031] 除非另外说明,否则如本文所述的浓度或浓度范围等任何数值都应理解为在所有情况下都被术语“约”修饰。因此,数值典型地包括±所列举值的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)。除非上下文另外明确指示,否则如本文所用,数值范围的使用明确包括所有可能的子范围、该范围内的所有单独数值,包括这样的范围内的整数和值的分数。

[0032] 除非另外指示,否则在一系列要素之前的术语“至少”应理解为指代系列中的每个要素。本领域技术人员仅使用常规实验就将认识到或能够确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等效方案。这样的等效方案旨在被本发明所涵盖。

[0033] 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)”、“含有(contains)”或“含有(containing)”或其其他任何变化将理解为暗示包括所陈述整数或整数组,但是不排除任何其他整数或整数组,并且旨在是非排他性的或开放式的。例如,包含一系列要素的组合物、混合物、工艺、方法、物品或设备不一定仅限于那些要素,而是可以包括未明确列出的或这种组合物、混合物、工艺、方法、物品或设备固有的其他要素。此外,除非明确相反说明,否则“或”是指包含性的或而不是排他性的或。例如,以下中的任一种情况都满足条件A或B:A为真(或存在)并且B为假(或不存在),A为假(或不存在)并且B为真(或存在),以及A和B二者都为真(或存在)。

[0034] 如本文所用,多个所列举要素之间的连接术语“和/或”应理解为涵盖单独的和组合的选项二者。例如,在两个要素由“和/或”连接的情况下,第一选项是指在没有第二要素的情况下第一要素的适用性。第二选项是指在没有第一要素的情况下第二要素的适用性。

第三选项是指第一要素和第二要素一起的适用性。这些选项中的任一个都应理解为落入该含义内,并且因此满足如本文所用的术语“和/或”的要求。多于一个的选项的同时适用性也应理解为落入该含义内,并且因此满足术语“和/或”的要求。

[0035] 如本文所用,如在整个说明书和权利要求所用的术语“由……构成(consists of)”或如“由……构成(consist of)”或“由……构成(consisting of)”等变化指示包括任何所列举整数或整数组,但是不能将另外的整数或整数组添加到指定的方法、结构或组合物中。

[0036] 如本文所用,如在整个说明书和权利要求所用的术语“基本上由……构成(consists essentially of)”或如“基本上由……构成(consist essentially of)”或“基本上由……构成(consisting essentially of)”等变化指示包括任何所列举整数或整数组,以及任选地包括不实质性改变指定的方法、结构或组合物的基本或新颖特性的任何所列举整数或整数组。参见M.P.E.P.§2111.03。

[0037] 本发明基于对国际公开WO 2023/020621中公开的抗CCR8抗体、特别是定义为H11-10的具有SEQ ID NO:1的重链和SEQ ID NO:2的轻链的抗体内的缺陷(liability)的认识。这些缺陷包括HCVR中抗原结合互补决定区(CDR)3中的天冬酰胺酰基(asparaginyl)残基,其易于脱酰胺并且活性随时间丧失;以及Fc区中的岩藻糖基化,其抑制抗体依赖的细胞毒性(ADCC)。由于CDR对于抗原结合的关键性质,HCVR CDR3中这些天冬酰胺酰基残基的任何修饰都可能降低抗体在CCR8靶标接合(target engagement)中的有效性。

[0038] 在一个实施方案中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSEQQYYYAMDY(SEQ ID NO:19)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8。在其中的特定实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:36的HCVR和/或SEQ ID NO:32的LCVR,特别是SEQ ID NO:36的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR。在其中的一个特定实施方案中,抗体是Ab001_M4,并且包含SEQ ID NO:6的重链和SEQ ID NO:2的轻链。

[0039] 在另一个实施方案中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包括:HC,该HC包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,该LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列。

[0040] 在另一个实施方案中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(a)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSEQNYYYAMDY(SEQ ID NO:16)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(b)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的

HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSENNYYYAMDY(SEQ ID NO:17)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(c)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSENQYYYAMDY(SEQ ID NO:18)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(d)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSDQNYYYAMDY(SEQ ID NO:20)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(e)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSDNQYYYAMDY(SEQ ID NO:21)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(f)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSDQQYYYAMDY(SEQ ID NO:22)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8。在其中的特定实施方案中,抗体包含(a)SEQ ID NO:33的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR,(b)SEQ ID NO:34的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR,(c)SEQ ID NO:35的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR,(d)SEQ ID NO:37的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR,(e)SEQ ID NO:38的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR,或(f)SEQ ID NO:39的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR。在其中的一个特定实施方案中,抗体是(a)Ab001_M1并且包含SEQ ID NO:3的重链和SEQ ID NO:2的轻链,(b)Ab001_M2并且包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:2的轻链,(c)Ab001_M3并且包含SEQ ID NO:5的重链和SEQ ID NO:2的轻链,(d)Ab001_M5并且包含SEQ ID NO:7的重链和SEQ ID NO:2的轻链,(e)Ab001_M6并且包含SEQ ID NO:8的重链和SEQ ID NO:2的轻链,或(f)Ab001_M7并且包含SEQ ID NO:9的重链和SEQ ID NO:2的轻链。

[0041] 在另一个实施方案中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包括:(a)HC,该HC包含与SEQ ID NO:3具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,该LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;(b)HC,该HC包含与SEQ ID NO:4具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,该LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;(c)HC,该HC包含与SEQ ID NO:5具有至少80%同

一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,该LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;(d)HC,该HC包含与SEQ ID NO:7具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,该LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;(e)HC,该HC包含与SEQ ID NO:8具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,该LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;或(f)HC,该HC包含与SEQ ID NO:9具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列;以及LC,该LC包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性并且具有其抗原结合特异性的序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8。

[0042] 术语“抗体”、“ab”、“免疫球蛋白”或“Ig”在最广泛的意义上是指具有相同结构特征的糖蛋白(即,含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子),并且涵盖各种抗体结构,包括天然或人工、单价或多价抗体,包括但不限于单克隆抗体(包括嵌合单克隆抗体、人源化单克隆抗体和人单克隆抗体,特别是人源化单克隆抗体)、多克隆抗体、单链抗体、抗体片段和多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。虽然抗体展现出对特异性抗原的结合特异性,但免疫球蛋白既包括抗体又包括缺乏抗原特异性的其他抗体样分子。“抗体”涵盖包含抗原结合位点的任何多肽,无论来源、起源物种、产生方法和特征如何。术语“抗体”还可以广泛地指代包含重链的CDR1、CDR2和CDR3以及轻链的CDR1、CDR2和CDR3的分子,其中分子能够与抗原结合。在一些实施方案中,抗体包含HCVR和LCVR。在一些实施方案中,抗体包含至少一条重链(HC)(其包含HCVR和至少一部分重链恒定区)和至少一条轻链(LC)(其包含LCVR和至少一部分轻链恒定区)。在一些实施方案中,抗体包含两条重链和两条轻链,其中每条重链包含HCVR和至少一部分重链恒定区,其中每条轻链包含LCVR和至少一部分轻链恒定区。

[0043] 在一些方面,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:33的HCVR序列和/或SEQ ID NO:32的LCVR序列、SEQ ID NO:34的HCVR序列和/或SEQ ID NO:32的LCVR序列、SEQ ID NO:35的HCVR序列和/或SEQ ID NO:32的LCVR序列、SEQ ID NO:37的HCVR序列和/或SEQ ID NO:32的LCVR序列、SEQ ID NO:8的HCVR序列和/或SEQ ID NO:32的LCVR序列,或HCVR序列是SEQ ID NO:39和/或LCVR序列是SEQ ID NO:32。

[0044] 在其他方面,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:33的HCVR序列和SEQ ID NO:32的LCVR序列、SEQ ID NO:34的HCVR序列和SEQ ID NO:32的LCVR序列、SEQ ID NO:35的HCVR序列和SEQ ID NO:32的LCVR序列、SEQ ID NO:37的HCVR序列和SEQ ID NO:32的LCVR序列、SEQ ID NO:38的HCVR序列和SEQ ID NO:32的LCVR序列、或SEQ ID NO:39的HCVR序列和SEQ ID NO:32的LCVR序列。

[0045] “天然抗体”和“完整免疫球蛋白”等通常是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链构成。来自任何脊椎动物物种的轻链都可以基于其恒定结构域的氨基酸序列被分配为两种明显不同的类型(称为kappa(κ)和lambda(λ))之一。根据其重链的恒定结构域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以被分配为不同的类别。有以下五个主要的免疫球蛋白类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的几种可以进一步分为亚类(同种型)。例如,IgG抗体包括但不限于IgG1(包含γ1恒定区)、IgG2(包含γ2恒定区)、IgG3(包含γ3恒定区)和IgG4(包含γ4恒定区)抗体;IgA抗体包括但不限于IgA1(包含α1恒定区)和IgA2(包含α2恒定区)抗体;并且IgM抗体包括但不限于IgM1(包含μ1恒定区)和IgM2(包含μ2恒定区)抗体。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称为α、

δ、ε、γ和μ。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。

[0046] 完整抗体可以具有一种或多种“效应子功能(effector functions)”,效应子功能是指归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区或任何其他经修饰的Fc区)的那些生物活性。抗体效应子功能的示例包括Clq结合;补体依赖的细胞毒性;Fc受体结合;ADCC;吞噬作用;下调细胞表面受体(例如,B细胞受体(BCR));以及通过抗原呈递细胞或树突细胞交叉呈递抗原。

[0047] 每条轻链通过一个共价二硫键连接至重链,而二硫键的数量在不同免疫球蛋白同种型的重链之间变化。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条重链在一端具有可变结构域(V_H),随后是多个恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域(V_L)并且在其另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。认为特定氨基酸残基在轻链与重链可变结构域之间形成界面。每个可变区包括称为互补决定区(CDR)或高变区的三个区段,并且可变结构域的更高度保守的部分被称为框架区(FR)。重链和轻链的可变结构域各自包括四个FR区,主要采用β-折叠构型,通过三个CDR连接,这些CDR形成连接β-折叠结构并且在一些情况下形成β-折叠结构的一部分的环。每条链中的CDR通过FR紧密保持在一起,并且与来自另一条链的CDR一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人,NIH出版号91-3242,第I卷,第647-669页[1991])。恒定结构域不直接地参与抗体与抗原的结合,但是展现出各种效应子功能,如抗体参与抗体依赖的细胞毒性。

[0048] 如本文所用的术语“重链可变区(HCVR)”至少是指包含重链CDR1(CDR-H1)、框架2(HFR2)、CDR2(CDR-H2)、FR3(HFR3)和CDR3(CDR-H3)的区域。在一些实施方案中,HCVR还包含在CDR-H1的N末端的FR1(HFR1)的至少一部分(例如,全部)和/或在CDR-H3的C末端的FR4(HFR4)的至少一部分(例如,全部)。在各种实施方案中,本文公开的任何HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:23的HFR1序列、SEQ ID NO:24的HFR2序列、SEQ ID NO:25的HFR3序列和/或SEQ ID NO:26的HFR4序列。

[0049] 如本文所用的术语“重链恒定区”是指包含至少三个重链恒定结构域CH1、CH2和CH3的区域。非限制性示例性重链恒定区包括γ、δ和α。非限制性示例性重链恒定区还包括ε和μ。每种重链恒定区对应于一种抗体同种型。例如,包含γ恒定区的抗体是IgG抗体,包含δ恒定区的抗体是IgD抗体,包含α恒定区的抗体是IgA抗体,包含ε恒定区的抗体是IgE抗体,并且包含μ恒定区的抗体是IgM抗体。

[0050] 如本文所用的术语“轻链可变区(LCVR)”是指包含轻链CDR1(CDR-L1)、框架(FR)2(LFR2)、CDR2(CDR-L2)、FR3(LFR3)和CDR3(CDR-L3)的区域。在一些实施方案中,LCVR还包含FR1(LFR1)的至少一部分(例如,全部)和/或FR4(LFR4)的至少一部分(例如,全部)。在各种实施方案中,本文公开的任何LCVR序列进一步包含SEQ ID NO:27的LFR1序列、SEQ ID NO:28的LFR2序列、SEQ ID NO:29的LFR3序列和/或SEQ ID NO:30的LFR4序列。

[0051] 如本文所用的术语“轻链恒定区”是指包含轻链恒定结构域CL的区域。非限制性示例性轻链恒定区包括λ和κ。

[0052] 如本文所用的术语“轻链”是指至少包含LCVR且具有或不具有前导序列的多肽。在一些实施方案中,轻链包含轻链恒定区的至少一部分。如本文所用的术语“全长轻链”是指包含LCVR和轻链恒定区且具有或不具有前导序列的多肽。

[0053] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即除了可以少量存在的可能天然存在的突变之外,构成群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体具有高度特异性,针对单一抗原位点。此外,与典型地包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的传统(多克隆)抗体制剂相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了其特异性外,单克隆抗体的优点还在于它们是通过杂交瘤培养合成的,未被其他免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆的”指示抗体的特征从基本上同质的抗体群体获得,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,要根据本发明使用的单克隆抗体可以通过由Kohler等人,Nature[自然],256:495(1975)首次描述的杂交瘤方法制备,或者可以通过重组DNA方法(参见例如,美国专利号4,816,567)制备。例如,“单克隆抗体”还可以使用Clackson等人,Nature[自然],352:624-628(1991)和Marks等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],222:581-597(1991)中描述的技术从噬菌体抗体文库分离。

[0054] 在一般方面,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。

[0055] 如本文所用,“与CCR8特异性结合”的抗体是指以1×10^{-7}M或更小、优选1×10^{-8}M或更小、更优选5×10^{-9}M或更小、1×10^{-9}M或更小、5×10^{-10}M或更小或1×10^{-10}M或更小的KD与CCR8、优选人CCR8结合的抗体和/或抗原结合结构域。在某些实施方案中,抗体和/或抗原结合结构域与食蟹猴CCR8结合。术语“KD”是指解离常数,其是从Kd与Ka的比率(即,Kd/Ka)获得的并且表示为摩尔浓度(M)。基于本公开,可以使用本领域的方法确定抗体的KD值。例如,可以通过使用表面等离子体共振(如通过使用例如Biacore®系统的生物传感器系统)或通过使用生物层干涉测量技术(bio-layer interferometry technology)(如Octet RED96系统)确定抗体的KD。

[0056] 抗体的KD值越小,抗体与靶抗原结合的亲和力越高。

[0057] 如本文所用,术语“IC_{50}”是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抑制浓度。IC_{50}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的功能的效力的量度。在某些实施方案中,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KD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。

[0058] 如本文所用,术语“EC_{50}”是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。EC_{50}是指单克隆或双特异性抗体或其抗原结合片段经指定的暴露时间在基线与最大值之间一半处诱导生物反应(例如,细胞死亡)的浓度。在某些实施方案中,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EC_{50}小于约1μM、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。

[0059] 在一方面,HCVR序列是SEQ ID NO:33和/或LCVR序列是SEQ ID NO:32,HCVR序列是SEQ ID NO:34和/或LCVR序列是SEQ ID NO:32,HCVR序列是SEQ ID NO:35和/或LCVR序列是SEQ ID NO:32,HCVR序列是SEQ ID NO:36和/或LCVR序列是SEQ ID NO:32,HCVR序列是SEQ ID NO:37和/或LCVR序列是SEQ ID NO:32,HCVR序列是SEQ ID NO:38和/或LCVR序列是SEQ ID NO:32,或HCVR序列是SEQ ID NO:39和/或LCVR序列是SEQ ID NO:32。

[0060] 在另一方面,本发明提供了分离的单克隆抗体,该分离的单克隆抗体包括:(a)包

含SEQ ID NO:3的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链;(b)包含SEQ ID NO:4的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链;(c)包含SEQ ID NO:5的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链;(d)包含SEQ ID NO:7的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链;(e)包含SEQ ID NO:8的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链;(f)包含SEQ ID NO:9的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链,其中抗体特异性结合CCR8。

[0061] 在一方面,抗体是人源化抗体。非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是含有源自非人免疫球蛋白的最少序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如Fv、Fab、Fab’、F(ab’)2或抗体的其他抗原结合子序列)。在大多数情况下,人源化抗体是这样的人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的CDR的残基被来自非人物种(供体抗体)(如小鼠、大鼠或兔)的具有所需特异性、亲和力和能力的CDR的残基替代。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv FR残基被对应的非人残基替代。此外,人源化抗体可以包含既不在受体抗体中也不在输入的CDR或FR序列中发现的残基。进行这些修饰以进一步改善并最大化抗体性能。通常,人源化抗体将包含至少一个并且典型地两个可变结构域的基本上全部,其中所有或基本上所有的CDR对应于非人免疫球蛋白的那些CDR,并且所有或基本上所有的FR是人免疫球蛋白序列的那些FR。人源化抗体还将最佳地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,典型地人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。关于进一步的细节,参见Jones等人,Nature[自然],321:522-525(1986);Reichmann等人,Nature[自然],332:323-329(1988);以及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.[结构生物学新见],2:593-596(1992)。人源化抗体包括PRIMATIZED™抗体,其中抗体的抗原结合区源自通过用目的抗原免疫猕猴产生的抗体。

[0062] 用于人源化非人抗体的方法是本领域熟知的。优选地,人源化抗体具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,它们典型地取自“输入”可变结构域。人源化基本上可以按照Winter及其同事的方法(Jones等人,Nature[自然],321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature[自然],332:323-327(1988);Verhoeyen等人,Science[科学],239:1534-1536[1988])通过将啮齿动物CDR或CDR序列取代为人抗体的对应序列来进行。因此,这样的“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利号4,816,567),其中远少于完整的人可变结构域已经被来自非人物种的对应序列取代。实际上,人源化抗体典型地是这样的人抗体,其中一些CDR残基和可能地一些FR残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。

[0063] 要用于制备人源化抗体的人可变结构域(轻链和重链二者)的选择对于降低抗原性是非常重要的。根据所谓的“最佳适配”法,针对已知人可变结构域序列的整个文库筛选啮齿动物抗体的可变结构域的序列。然后将最接近啮齿动物序列的人序列接受为人源化抗体的人FR(Sims等人,J.Immunol.[免疫学杂志],151:2296(1993);Chothia等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],196:901[1987])。另一种方法使用源自轻链或重链的特定亚组的所有人抗体的共有序列的特定FR。相同的FR可以用于几种不同的人源化抗体(Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],89:4285(1992);Presta等人,J.Immunol.[免疫学杂志],151:2623[1993])。

[0064] 进一步重要的是在保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物特性的情况下人源化抗体。为了实现这个目标,根据优选的方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念人源化产物的过程来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的,并且是本领域技术人员熟悉的。图示并展示所选的候选免疫球蛋白序列的可能的

三维构象结构的计算机程序是可获得的。检查这些展示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,可以从受体和输入序列中选择并组合FR残基,使得实现所需抗体特征,如对一种或多种靶抗原的增加的亲和力。通常,CDR残基直接且最实质地参与影响抗原结合。

[0065] 可替代地,现在有可能产生在免疫接种后能够在不存在内源性免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的完整库的转基因动物(例如,小鼠)。例如,已经描述了嵌合和胚系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失导致内源性抗体产生的完全抑制。在这样的胚系突变小鼠中转移人胚系免疫球蛋白基因阵列将导致抗原激发后产生人抗体。参见例如,Jakobovits等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],90:2551(1993);Jakobovits等人,Nature[自然],362:255-258(1993);Bruggermann等人,Year in Immuno.[免疫学的一年],7:33(1993)。人抗体还可以源自噬菌体展示文库(Hoogenboom等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],222:581-597[1991])。

[0066] 可以通过用来自人Fv可变区的等效序列替代不直接参与抗原结合的Fv可变区的序列来人源化抗体。人源化嵌合抗体的一般性综述由Morrison等人(Science[科学]229:1202-1207(1985))和Oi等人(BioTechniques[生物技术]4:214(1986))提供。这些方法包括分离、操纵和表达编码来自重链或轻链中的至少一个的全部或部分免疫球蛋白Fv可变区的核酸序列。这样的核酸的来源是本领域技术人员熟知的,并且例如可以从例如产生抗体的杂交瘤获得。然后可以将编码人源化或嵌合抗体或其片段的重组DNA克隆到适当的表达载体中。

[0067] 可替代地,人源化抗体可以通过CDR取代产生(美国专利号5,225,539;Jones,Nature[自然]321:552-525(1986);Verhoeyan等人,Science[科学]239:1534(1988);以及Beidler,J.Immunol.[免疫学杂志]141:4053-4060(1988))。

[0068] 在另一方面,其抗原结合片段是Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、单链Fv或scFv、二硫键连接的F_v、V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、$IgGACH_2$、微型抗体、$F(ab')_3$、四抗体、三抗体、双抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

[0069] 实验性地,抗体可以用蛋白水解酶木瓜蛋白酶切割,这导致每条重链断裂,产生三个单独的抗体片段。“抗体片段”包括完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的示例包括Fab、Fab'和F(ab')2、Fc片段或Fc融合产物、单链Fv(scFv)、二硫键连接的Fv(sdfv)和包括VL或VH结构域的片段;双抗体、三抗体等(Zapata等人Protein Eng.[蛋白质工程]8(10):1057-1062[1995])。术语“抗体片段”或(抗体的)“抗原结合部分”包括但不限于能够结合抗原的片段。由轻链和在质量上与轻链大致相等的重链片段构成的两个单元被称为Fab片段(即,“抗原结合”片段)。由重链的两个相等区段构成的第三单元被称为Fc片段。Fc片段典型地不参与抗原-抗体结合,但是在涉及清除体内抗原的后期过程中是重要的。

[0070] Fab片段含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。“Fab”是指分子量为大约50,000道尔顿的抗体片段,并且具有与抗原结合的活性。它包含通过二硫桥连接的重链的N末端侧的大约一半和整条轻链。Fab可以特别地通过经由蛋白酶(木瓜蛋白酶)处理免疫球蛋白来获得。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在重链CH1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。Fab'-SH在本文中是这样的Fab'的名称,其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基携带游离的巯基。

[0071] F(ab')2抗体片段最初作为Fab'片段对产生,它们之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。术语"$F(ab')_2$"指的是大约100,000道尔顿并且具有与抗原结合的活性的片段。该片段略大于经由铰链区中的二硫桥连接的两个Fab片段。这些片段是通过用蛋白酶(胃蛋白酶)处理免疫球蛋白来获得的。Fab片段可以通过切割铰链区的二硫桥从F(ab')2片段获得。

[0072] 抗体的Fc区是抗体的与细胞表面受体和补体系统的一些蛋白质相互作用的尾区。这种特性允许抗体激活免疫系统。在IgG、IgA和IgD抗体同种型中,Fc区由源自抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域的两个相同的蛋白质片段构成;在每条多肽链中IgM和IgE Fc区含有三个重链恒定结构域(CH结构域2-4)。IgG的Fc区携带高度保守的N-糖基化位点。Fc片段的糖基化对于Fc受体介导的活性是必需的。附接至该位点的N-聚糖主要是复杂类型的核心岩藻糖基化的二触角结构。此外,少量的这些N-聚糖还携带平分型GlcNAc和α-2,6连接的唾液酸残基。

[0073] Fc融合蛋白(也称为Fc嵌合融合蛋白、Fc-Ig、基于Ig的嵌合融合蛋白和Fc-标签蛋白)由遗传连接至目的肽或蛋白质的IgG的Fc结构域构成。Fc融合蛋白已经成为用于体内和体外研究的有价值的试剂。Fc融合的结合伴侣(binding partners)的范围可以是单一肽、在与细胞表面受体结合后激活的配体、信号传导分子、在二聚化后激活的受体的胞外结构域或作为用于鉴定蛋白质微阵列中的结合伴侣的诱饵蛋白。Fc结构域在体内最有价值的特征之一是它可以显著延长目的蛋白质的血浆半衰期,对于生物治疗药物,这导致治疗功效改善;该属性使Fc融合蛋白成为有吸引力的生物治疗剂。

[0074] Fc融合蛋白可以是包括Fc融合蛋白和药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物的一部分。药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂是本领域熟知的(Remington'sPharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学],第16版,Osol,A.编辑(1980))。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且可以包括缓冲液,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);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;亲水性聚合物,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、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反荷离子,如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0075] "Fv"是含有完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。"scFv"的二聚体对应于通过肽键连接在一起的两个scFv分子。该Fv链经常是融合基因表达的结果,该融合基因包括通过编码肽的接头序列连接的编码VH和VL的基因。人scFv片段可以包括优选地通过使用遗传重组技术的手段以适当构象维持的CDR区。该区域由紧密非共价缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体构成。正是在该构型中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以将抗原结合位点限定在VH-VL二聚体的表面上。共同地,六个CDR为抗体赋予

抗原结合特异性。然而,即使单个可变结构域(或仅包含三个对抗原具有特异性的CDR的Fv的一半)也具有识别并结合抗原的能力,但亲和力低于整个结合位点。

[0076] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单条多肽链中。优选地,Fv多肽进一步包含VH与VL结构域之间的多肽接头,它使得scFv能够形成用于抗原结合的所需结构。关于scFv的综述,参见Pluckthun,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies[单克隆抗体的药理学],第113卷,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag[施普林格出版社],纽约,第269-315页(1994)。

[0077] “dsFv”片段是通过二硫桥稳定的VH-VL异二聚体;它可以是二价的($dsFV_2$)。二价$Sc(Fv)_2$或多价抗体的片段可以通过单价scFvs的缔合自发形成,或者通过经由肽结合序列连接scFv片段而产生。

[0078] Fc片段支持抗体的生物特性,特别是其被免疫效应物识别或激活补体的能力。它由重链的铰链区之外的恒定片段构成。

[0079] 术语“双抗体”意指具有两个抗原固定位点的小抗体片段。这些片段在同一条VH-VL多肽链中包含连接至可变轻链结构域VL的可变重链结构域VH。使用太短而不允许同一条链的两个结构域匹配的结合序列,必然发生与另一条链的两个互补结构域的匹配,并且因此产生两个抗原固定位点。

[0080] 已经开发了用于产生抗体片段的各种技术。传统地,这些片段是经由完整抗体的蛋白水解消化而得到(参见例如,Morimoto等人,Journal of Biochemical and Biophysical Methods[生物化学和生物物理方法杂志]24:107-117(1992)和Brennan等人,Science[科学],229:81[1985])。然而,现在可以通过重组宿主细胞直接产生这些片段。例如,可以从以上讨论的抗体噬菌体文库分离抗体片段。可替代地,可以直接从大肠杆菌回收Fab'-SH片段,并且将其化学偶联以形成F(ab')2片段(Carter等人,Bio/Technology[生物/技术]10:163-167[1992])。根据另一种方法,可以直接从重组宿主细胞培养物分离F(ab')2片段。用于产生抗体片段的其他技术对于熟练从业人员将是清楚的。在其他实施方案中,选择的抗体是单链Fv片段(scFv)。参见WO 93/16185。

[0081] 在其他方面,单克隆抗体或其抗原结合片段以小于约25nM、20nM、15nM、10nM、5nM、2nM、1nM、0.5nM或0.01nM的K_d结合人CCR8。

[0082] 术语“抗原结合结构域”是指抗体分子的包含与抗原的一部分或全部特异性结合或互补的区域的部分。在抗原较大的情况下,抗体可以仅与抗原的特定部分结合。“表位”或“抗原决定簇”是抗原分子的负责与抗体的抗原结合结构域相互作用的部分。抗原结合结构域可以由一个或多个抗体可变结构域(例如,由VH结构域构成的所谓的Fd抗体片段)提供。抗原结合结构域可以包含抗体LCVR和抗体HCVR。

[0083] 根据本发明的“抗原”覆盖将引起免疫应答的任何物质。特别地,“抗原”涉及与抗体或T淋巴细胞(T细胞)特异性反应的任何物质,优选肽或蛋白质。根据本发明,术语“抗原”包括包含至少一个表位的任何分子。优选地,在本发明的上下文中的抗原是任选地在处理后诱导免疫反应的分子。根据本发明,可以使用任何合适的抗原,它是免疫反应的候选物,其中免疫反应优选地是细胞免疫反应。在本发明的实施方案的上下文中,抗原优选地由细胞、优选地由抗原呈递细胞呈递,该抗原呈递细胞包括患病细胞、特别是癌细胞(在MHC分子的情况下),这导致针对抗原的免疫反应。抗原优选地是对应于天然存在的抗原的产物,或

者源自天然存在的抗原。这样的天然存在的抗原包括肿瘤抗原。

[0084] 术语“表位”是指分子(如抗原)中的抗原决定簇,即是指由免疫系统识别的分子部分或片段。蛋白质(如肿瘤抗原)的表位优选地包含所述蛋白质的连续或不连续部分。

[0085] 术语“表位”、“抗原肽”、“抗原表位”、“免疫原性肽”和“MHC结合肽”可以在本文中可互换地使用,并且优选地涉及抗原的不完全表示,该抗原优选地能够引起针对抗原或细胞(其表达或包含并且优选地呈递抗原)的免疫应答。

[0086] 术语“结合亲和力”通常是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合伴侣之间的非共价相互作用的总和的强度。测量结合亲和力或结合活性的多种方法是本领域已知的,其中的任何方法都可以用于本发明的目的。以下描述了具体的说明性实施方案。

[0087] 如本文所用,“特异性结合”是指抗体与预定抗原结合。典型地,抗体以对应于约10^{-8}M或更小的K_D的亲和力结合,并且抗体以这样的亲和力(如由K_D表示)与预定抗原结合,该亲和力是抗体与预定抗原或密切相关抗原以外的非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)结合的亲和力的至少1/10,并且优选至少1/100。可替代地,抗体可以以对应于约10^6M^{-1}、或约10^7M^{-1}、或约10^8M^{-1}、或10^9M^{-1}或更高的K_A的亲和力结合,并且抗体以这样的亲和力(如由K_A表示)与预定抗原结合,该亲和力是抗体与预定抗原或密切相关抗原以外的非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)结合的亲和力的至少10倍,并且优选至少100倍。

[0088] 如本文所用,术语“k_d”(sec^{-1})旨在指代特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。该值也被称为off值。如本文所用,术语“K_D”(M^{-1})旨在指代特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0089] 在一些实施方案中,本发明的CCR8结合抗体对CCR8(例如,对人CCR8)的解离常数(K_d)≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如,10^{-8}M或更小,例如从10^{-8}M至10^{-13}M,例如从10^{-9}M至10^{-13}M)。在某些实施方案中,CCR8结合抗体对CCR8(例如,对人CCR8)的解离常数(K_d)≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如,10^{-8}M或更小,例如从10^{-8}M至10^{-13}M,例如从10^{-9}M至10^{-13}M)。

[0090] 如本文所用,术语“k_a”($M^{-1}sec^{-1}$)旨在指代特定抗体-抗原相互作用的缔合速率常数。如本文所用,术语“K_A”(M)旨在指代特定抗体-抗原相互作用的平衡缔合常数。

[0091] 如本文所述,抗CCR8抗体也可以被称为WT抗CCR8抗体(具有含有SEQ ID NO:31的序列的HCVR和/或含有SEQ ID NO:32的序列的LCVR),以及被称为其突变体。如本文所用,术语“突变体”抗体是指在CDR3中具有突变以消除野生型序列中N104和/或N105处天冬酰胺酰基残基的翻译后修饰(脱酰胺和异构化)的抗体。3个氨基酸的序列103-105(DNN)的突变减少或防止脱酰胺和异构化,从而改善抗体的稳定性和效力。特别地,DNN序列突变为EQQ防止脱酰胺,并且保留与亲本抗体等效地结合CCR8。这种修饰延长了突变抗体的活性半衰期,大大超过亲本抗体的活性半衰期。

[0092] 具有SEQ ID NO:33-39中任一个的HCVR序列和具有SEQ ID NO:32的序列的LCVR的抗体被称为突变体抗CCR8抗体。特别地,具有SEQ ID NO:36的HCVR序列和SEQ ID NO:32的LCVR序列的抗体是优选的突变体抗CCR8抗体。

[0093] 在一方面,抗体诱导抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。ADCC是免疫系统的效应细胞主动裂解靶细胞的细胞介导的免疫防御机制,该靶细胞的膜表面抗原已经被特异性抗体结合。这是作为体液免疫应答的一部分的抗体可以起作用以限制和遏制感染的机制

之一。ADCC独立于也裂解靶标但不需要任何其他细胞的免疫补体系统。ADCC需要效应细胞，其通常已知是典型地与免疫球蛋白G(IgG)抗体相互作用的自然杀伤(NK)细胞。然而，巨噬细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞也可以介导ADCC，如经由IgE抗体杀伤某些称为蠕虫的寄生虫的嗜酸性粒细胞。通常，ADCC典型地被描述为对抗体包被的细胞的免疫应答，最终导致感染细胞或非宿主细胞的裂解。在最近的文献中，其在治疗癌细胞方面的重要性和对其看似复杂的途径的深入了解一直是医学研究人员越来越感兴趣的话题。

[0094] 如本文所用，术语“变体”抗体是指具有可变水平的岩藻糖基化的抗体。去岩藻糖基化的单克隆抗体是在工程化细胞中或在选定条件下产生的单克隆抗体，使得与在非工程化细胞中或在正常条件下的产生相比，去岩藻糖基化的单克隆抗体的Fc区中的寡糖具有减少的岩藻糖单元或不具有岩藻糖单元。当抗体被去岩藻糖基化时，ADCC增加。大多数经批准的单克隆抗体属于IgG1同种型，其中两个N-连接的双触角复合型寡糖结合至Fc区。Fc区通过其与Fcγ R家族的白细胞受体的相互作用来行使ADCC的效应子功能。ADCC在癌症抗体的功效中是重要的，但是对于许多经批准的癌症抗体，由于非特异性IgG与药物竞争结合自然杀伤细胞上的Fcγ IIIa，ADCC比可能期望的要少。去岩藻糖基化的单克隆抗体通过改善的Fcγ IIIa结合克服了该问题。

[0095] 在其综述中，Pereira等人(MABS[单克隆抗体]2018，第10卷，第5期，693-711)讨论了抗体核心岩藻糖基化与ADCC的相关性、产生去岩藻糖基化抗体的不同策略、以及目前正在进行临床试验的去岩藻糖基化抗体药物以及已经被批准的那些抗体药物的更新。将文章中的公开内容以其全文特此并入本申请。

[0096] 在另一方面，抗体具有至少50％的去岩藻糖基化水平。例如，抗体具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或更高的去岩藻糖基化水平。

[0097] 在各方面，抗体具有至少85％的去岩藻糖基化水平。例如，抗体具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高的去岩藻糖基化水平。

[0098] 在另一个实施方案中，本发明提供了治疗有需要的受试者的癌症的方法，该方法包括向受试者施用有效量的本文所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段中的任一种，从而治疗受试者的癌症。

[0099] 在另一个实施方案中，本发明提供了治疗有需要的受试者的癌症的方法，该方法包括向受试者施用有效量的如本文所提供的至少一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，从而治疗受试者的癌症。在一方面，方法包括施用抗体，该抗体具有HCVR，该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSEQQYYYAMDY(SEQ ID NO:19)的HCVR CDR3序列；以及LCVR，该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列，从而治疗受试者的癌症。在其中的特定实施方案中，抗体包含SEQ ID NO:36的HCVR和SEQ ID NO:32的LCVR。在其中的一个特定实施方案中，抗体是Ab001_M4，并且包含SEQ ID NO:6的重链和SEQ ID NO:2的轻链。

[0100] 如本文所用的术语“受试者”是指对其进行主题方法的任何个体或患者。通常，受

试者是人,但如本领域技术人员将理解的,受试者可以是动物。因此,其他动物(包括脊椎动物,如啮齿动物(包括小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠)、猫、狗、兔、农场动物(包括牛、马、山羊、绵羊、猪、鸡等)和灵长类动物(包括猴、黑猩猩、猩猩和大猩猩)包括在受试者的定义内。

[0101] 术语“治疗”与术语“治疗方法”在本文中可互换地使用,并且是指1)治愈、减慢、减轻诊断的病理病症或障碍的症状和/或停止诊断的病理病症或障碍的进展的治疗性治疗或措施,以及2)预防/预防性的措施。需要治疗的那些个体可以包括已经患有特定医学障碍的个体以及可能最终患上障碍的那些个体(即,需要预防性措施的那些个体)。“治疗”覆盖在哺乳动物(包括人)中用于疾病(在本文中也称为“障碍”或“病症”)的治疗剂的任何施用或应用,并且包括抑制疾病或疾病进展,抑制或减缓疾病或其进展,阻止其发展,部分或完全缓解疾病,部分或完全缓解疾病的一种或多种症状,或恢复或修复丧失的、缺失的或有缺陷的功能;或刺激低效过程。术语“治疗”还包括降低任何表型特征的严重程度和/或降低该特征的发生率、程度或可能性。

[0102] 术语“治疗有效量”、“有效剂量”、“治疗有效剂量”、“有效量”等是指研究人员、兽医、医生或其他临床医生正在寻求的将引起组织、系统、动物或人的生物或医学应答的主题化合物的量。通常,应答是患者的症状的改善或所需生物结局(例如,癌症的治疗)。本发明的CCR8拮抗剂的治疗有效量可以根据诸如以下的因素而变化:个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及拮抗剂在个体中引起所需应答的能力。治疗有效量涵盖治疗有益作用超过CCR8拮抗剂的任何毒性或有害作用的量。

[0103] 术语“施用(administration of)”和/或“施用(administering)”应当理解为意指向需要治疗的受试者提供治疗有效量的药物组合物。施用途径可以是肠内、局部或肠胃外。因此,施用途径包括但不限于皮内、皮下、静脉内、腹膜内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、皮内、经皮、经气管、表皮下、关节点内、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内、口服、舌下、经颊、直肠、阴道、鼻部、眼部施用以及输注、吸入和雾化。如本文所用的短语“肠胃外施用(parenteral administration)”和“肠胃外施用(administered parenterally)”意指肠内和局部施用以外的施用方式。在各种实施方案中,可以皮下或静脉内施用抗CCR8抗体。

[0104] 本文所述的抗体及其抗原结合片段可以制备为包含抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体的药物组合物。“药学上可接受的载体”是指本领域传统的用于与治疗剂一起使用的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料、配制助剂或载体,这些物质和治疗剂共同构成用于向受试者施用的“药物组合物”。药学上可接受的载体在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且与剂型的其他成分相容。药学上可接受的载体适用于所采用的配制品。例如,如果要口服施用治疗剂,则载体可以是凝胶胶囊。如果要皮下施用治疗剂,则载体理想地对皮肤不过敏,并且不引起注射部位反应。

[0105] 可以根据施用方法以多种单位剂型施用药物组合物。合适的单位剂型包括但不限于散剂、片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂、栓剂、贴剂、鼻喷雾剂、注射剂、可植入缓释配制品、脂质复合物等。

[0106] 主题组合物可以被配制成呈固体、半固体、液体或气体形式的制剂;包括但不限于片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、灌肠剂、注射剂、吸入剂和气雾剂。

[0107] 在各种实施方案中,包含CCR8拮抗剂的组合物以具有各种各样的药学上可接受的载体的配制品提供(参见例如,Gennaro,Drugfacts Plus[药物事实+],第20版(2003);

Ansel等人,Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems[药物剂型和药物递送系统],第7版,Lippencott Williams and Wilkins[利平科特·威廉姆斯·威尔金斯出版社](2004);Kibbe等人,Handbook of Pharmaceutical Excipients[药物赋形剂手册],第3版,Pharmaceutical Press[英国医药出版社](2000))。各种药学上可接受的载体(其包括媒介物、佐剂和稀释剂)是可获得的。此外,各种药学上可接受的辅助物质(如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、湿润剂等)也是可获得的。非限制性示例性载体包括盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇及其组合。

[0108] 在各种实施方案中,包含CCR8拮抗剂的组合物可以被配制用于注射(包括皮下施用),通过将它们溶解、悬浮或乳化在水性或非水性溶剂(如植物油或其他油、合成脂肪酸甘油酯、高级脂肪酸酯或丙二醇)中;并且如果需要的话,与传统添加剂(如增溶剂、等渗剂(isotonic agents)、助悬剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂)一起。

[0109] 在各种实施方案中,组合物可以被配制用于吸入,例如使用加压的可接受的推进剂(如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等)。

[0110] 在各种实施方案中,组合物还可以被配制成缓释微胶囊,如用可生物降解的或不可生物降解的聚合物。非限制性示例性可生物降解的配制品包括聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)聚合物。非限制性示例性不可生物降解的配制品包括聚甘油脂肪酸酯。制备这样的配制品的某些方法描述于例如EP 1125584 A1中。

[0111] 还提供了包含一个或多个容器的药物剂量包装,每个容器含有一个或多个剂量的抗CCR8抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中,提供了单位剂量,其中单位剂量含有预定量的包含抗CCR8抗体及其抗原结合片段的组合物,且具有或不具有一种或多种另外的药剂。在一些实施方案中,这种单位剂量在供注射的一次性预填充注射器中提供。在各种实施方案中,在单位剂量中所含的组合物可以包含盐水、蔗糖等;缓冲剂,如磷酸盐等;和/或可以被配制在稳定且有效的pH范围内。可替代地,在一些实施方案中,组合物可以作为冻干粉提供,该冻干粉可以在添加适当的液体(例如,无菌水)后重构。在一些实施方案中,组合物包含一种或多种抑制蛋白质聚集的物质,包括但不限于蔗糖和精氨酸。在一些实施方案中,本发明的组合物包含肝素和/或蛋白聚糖。

[0112] 以有效治疗或预防特定适应证的量施用药物组合物。治疗有效量典型地取决于所治疗受试者的体重、他或她的身体或健康状况、要治疗的病症的广泛性或所治疗受试者的年龄。

[0113] 在一些实施方案中,可以以每剂约50μg/kg体重至约50mg/kg体重范围内的量施用抗CCR8抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中,可以以每剂约100μg/kg体重至约50mg/kg体重范围内的量施用抗CCR8抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中,可以以每剂约100μg/kg体重至约20mg/kg体重范围内的量施用抗CCR8抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中,可以以每剂约0.5mg/kg体重至约20mg/kg体重范围内的量施用抗CCR8抗体及其抗原结合片段。

[0114] 在一些实施方案中,可以以每剂约10mg至约1,000mg范围内的量施用抗CCR8抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中,可以以每剂约20mg至约500mg范围内的量施用抗CCR8抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中,可以以每剂约20mg至约300mg范围内的量施用抗CCR8抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中,可以以每剂约20mg至约200mg范围

内的量施用抗CCR8抗体及其抗原结合片段。

[0115] 可以根据需要向受试者施用抗CCR8抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中，向受试者一次或多次施用有效剂量的抗CCR8抗体及其抗原结合片段。在各种实施方案中，向受试者每月一次、每月少于一次(诸如，例如每两个月、每三个月或每六个月)施用有效剂量的抗CCR8抗体及其抗原结合片段。在其他实施方案中，每月多于一次(诸如，例如每两周、每周、每周两次、每周三次、每天或每天多次)施用有效剂量的抗CCR8抗体及其抗原结合片段。向受试者至少一次施用有效剂量的抗CCR8抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中，可以多次施用有效剂量的CCR8拮抗剂，包括持续至少一个月、至少六个月或至少一年的时间段。在一些实施方案中，根据需要向受试者施用抗CCR8抗体及其抗原结合片段以缓和病症的一种或多种症状。

[0116] 本文所述的抗体可以用于治疗癌症。

[0117] 癌症是一组涉及异常细胞生长且有可能侵入或扩散到身体的其他部位的疾病。在2015年，约有9050万人患有癌症，每年约有1410万例新病例发生，并且造成了约880万例死亡(占死亡人数的15.7％)。男性中最常见的癌症类型是肺癌、前列腺癌、结直肠癌和胃癌。在女性中，最常见的类型是乳腺癌、结直肠癌、肺癌和宫颈癌。

[0118] 术语“癌症”是指一组这样的疾病，其特征在于从一个部位(原发部位)开始的异常且不受控制的细胞增殖，且有可能侵入并扩散到其他部位(继发部位，转移)，这将癌症(恶性肿瘤)与良性肿瘤区分开。实际上，所有器官都可能受到影响，导致可能影响人的100多种类型的癌症。癌症可能由许多原因引起，包括遗传倾向、病毒感染、暴露于电离辐射、暴露于环境污染物、烟草和/或酒精使用、肥胖、不良饮食、缺乏体力活动或其任何组合。

[0119] 如本文所用，“赘生物”或“肿瘤”(包括其语法变化)意指组织的新且异常的生长，它可能是良性的或癌性的。在相关方面，赘生物指示肿瘤疾病或障碍，包括但不限于各种癌症。例如，这样的癌症可以包括前列腺癌、胰腺癌、胆管癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、肾癌、肺癌、睾丸癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、脑癌和头颈癌、黑色素瘤、肉瘤、多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤等。

[0120] 在一方面，癌症是血液癌症或实体瘤。

[0121] 开始于血液形成组织(如骨髓)或免疫系统的细胞的癌症被称为血液癌症或血癌。血液癌症影响血细胞的产生和功能，并且被分类为以下三种主要类型：白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

[0122] 如本文所用，“白血病”是指由异常白细胞的快速产生引起的血癌。白血病的示例包括急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病和毛细胞白血病。

[0123] 如本文所用，“淋巴瘤”是指影响淋巴系统的血癌的类型。淋巴瘤的示例包括艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样肉芽肿病、非霍奇金淋巴瘤、原发中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤和华氏巨球蛋白血症。

[0124] 如本文所用，“骨髓瘤”是浆细胞的癌症。骨髓瘤的示例包括慢性骨髓增殖性赘生物、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、多发性骨髓瘤、浆细胞赘生物、骨髓增生异常综合征和骨髓增生异常/骨髓增殖性赘生物。

[0125] 在一些实施方案中，本发明的抗CCR8抗体可以单独使用，或者可替代地与已知能

够治疗疾病或适应证的任何其他合适的化合物组合使用。

[0126] 在一些方面,施用可以与一种或多种另外的治疗剂组合。短语“组合疗法”、“与……组合”等是指同时使用多于一种药物或治疗来增加应答。本发明的组合物可以例如与用于治疗癌症的其他药物或治疗组合使用。特别地,向受试者施用本发明的组合物可以与任何抗癌疗法组合。可以在施用本发明的组合物之前、同时或之后施用这样的疗法。

[0127] 在某些实施方案中,向受试者(例如,患有癌症的受试者)同时或连续地施用抗CCR8抗体与另一种治疗。例如,可以与以下中的一种或多种一起施用抗CCR8抗体:放射疗法、手术或化学疗法,例如靶向化学疗法或免疫疗法。两种药剂的施用可以在例如相隔30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、3小时、6小时、12小时、24小时、36小时、48小时、3天、5天、7天或一周或几周的时间开始,或者第二药剂的施用可以在已经施用第一药剂后例如30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、3小时、6小时、12小时、24小时、36小时、48小时、3天、5天、7天或一周或几周开始。

[0128] 在一些方面,血液癌症选自由以下构成的组:急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、毛细胞白血病、艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样肉芽肿病、非霍奇金淋巴瘤、原发中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)以及多发性骨髓瘤。

[0129] 实体癌的示例包括但不限于癌、肉瘤、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、垂体癌、食管癌、星形细胞瘤、软组织肉瘤、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌(kidney cancer)、肾癌(renal cancer)、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、脑癌、子宫内膜癌、睾丸癌、胆管癌、胆囊癌、胃癌、黑色素瘤和各种类型的头颈癌。

[0130] 在其他方面,实体瘤选自由以下构成的组:乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结肠癌、肾癌、卵巢癌、肝癌和前列腺癌。

[0131] 在另一个实施方案中,本发明提供了治疗有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段具有HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSEQQQYYYAMDY(SEQ ID NO:19)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列,从而治疗受试者的癌症。

[0132] 在一些方面,本文所述的方法进一步包括向患者施用化学治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂和/或抗肿瘤组合物。

[0133] “化学治疗剂”是可用于治疗癌症的化学化合物。化学治疗剂的示例包括但不限于烷化剂,如噻替哌和环磷酰胺(cyclosphosphamide);烷基磺酸盐,如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶,如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙烯亚胺和甲基蜜胺(methylamelamine),包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚

乙基磷酰胺(triethylenephosphoramide)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethiylenethiophosphoramide)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰(尤其是布拉它辛和布拉它辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成类似物拓扑替康);苔藓虫素;卡利他汀(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);念珠藻素(特别是念珠藻素1和念珠藻素8);尾海兔素;倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥类,如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧化氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝基脲(nitrosurea),如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀(ranimnustine);抗生素,如烯二炔类抗生素(例如,卡奇霉素(calicheamicin),尤其是卡奇霉素γ11和卡奇霉素ω11(参见例如,Agnew,Chem lntl.Ed.Engl[德国应用化学国际英语版],33:183-186(1994);达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;二膦酸盐,如氯膦酸盐;埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素发色团和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomysin)、放线菌素、氨茴霉素(authramycin)、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡柔比星(carabicin)、洋红霉素、嗜癌素、色霉素、更生霉素、道诺霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉并-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(如丝裂霉素C)、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星、链黑菌素、链脲佐菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物,如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素,如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺素,如氨鲁米特、米托坦、曲络司坦;叶酸补充剂,如亚叶酸(frolinic acid);醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吖啶;贝斯布西(bestrabucil);比生群;依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛;地吖醌;依氟鸟氨酸(elfomithine);依利醋铵;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明(lonidainine);美登木素生物碱,如美登素和安丝菌素;米托胍腙;米托蒽醌;莫哌达醇(mopidanmol);二胺硝吖啶(nitraerine);喷司他丁;蛋氨氮芥;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;多糖复合物(JHS天然产品公司(JHS Natural Products),俄勒冈州尤金);雷佐生;利索新;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2′,2”-三氯三乙胺;单端孢霉烯(尤其是T-2毒素、疣孢菌素(verracurin)A、漆斑菌素A和蛇行菌素(anguidine));乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;加西托新(gacytosine);阿拉伯糖苷(“Ara-C”);环磷酰胺;噻替哌;紫杉烷,例如紫杉醇(百时美施贵宝公司肿瘤学部门(Bristol-Myers Squibb Oncology),新泽西州普林斯顿)、不含克列莫佛的紫杉醇的经白蛋白工程化的纳米颗粒配制品(美国药品伙伴公司(American Pharmaceutical Partners,伊利诺伊州绍姆堡)和多西他赛(doxetaxel)(罗纳布朗克罗莱尔公司(Rhone-Poulenc Rorer),法国安东尼);苯丁酸氮芥;吉西他滨

(gerncitabine);6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,如顺铂、奥沙利铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺消灵(novantrone);替尼泊苷;依达曲沙;柔红霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;伊立替康(依立替康,CPT-11)(包括伊立替康与5-FU和甲酰四氢叶酸的治疗方案);拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(difluorometlhylornithine,DMFO);类视黄醇,如视黄酸;卡培他滨;康普瑞汀;甲酰四氢叶酸(LV);奥沙利铂,包括奥沙利铂治疗方案(FOLFOX);减少细胞增殖的PKC-α、Raf、H-Ras、EGFR(例如,厄洛替尼)和VEGF-A的抑制剂,以及以上任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0134] 其他非限制性示例性化学治疗剂包括起作用以调节或抑制激素对癌症的作用的抗激素剂,如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERM),包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、考昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬;抑制芳香化酶(其调节肾上腺中的雌激素产生)的芳香化酶抑制剂,诸如,例如4(5)-咪唑、氨鲁米特、醋酸甲地孕酮、依西美坦、福美司坦(formestanie)、法倔唑、伏氯唑、来曲唑和阿那曲唑;以及抗雄激素,如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及曲沙他滨(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸,特别是抑制涉及异常细胞增殖的信号传导途径中基因(诸如例如PKC-α、Ralf和H-Ras)的表达的那些反义寡核苷酸;核酶,如VEGF表达抑制剂和HER2表达抑制剂;疫苗,如基因疗法疫苗;rIL-2;拓扑异构酶1抑制剂;rmRH;以及以上任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0135] “抗血管生成剂”或“血管生成抑制剂”是指直接或间接抑制血管生成、血管发生或不希望的血管通透性的小分子量物质、多核苷酸(包括例如抑制性RNA(RNAi或siRNA)、多肽、分离的蛋白质、重组蛋白质、抗体或其缀合物或融合蛋白。应当理解,抗血管生成剂包括结合血管生成因子或其受体并且阻断血管生成因子或其受体的血管生成活性的那些药剂。例如,抗血管生成剂是针对血管生成剂的抗体或其他拮抗剂,例如针对VEGF-A(例如,贝伐单抗)或VEGF-A受体(例如,KDR受体或Flt-1受体)的抗体、抗PDGFR抑制剂如(甲磺酸伊马替尼)、阻断VEGF受体信号传导的小分子(例如,PTK787/ZK2284、SU6668、SUI1248(苹果酸舒尼替尼)、AMG706或描述于例如国际专利申请WO 2004/113304中的那些小分子)。抗血管生成剂还包括天然血管生成抑制剂,例如血管抑素、内皮抑素等。参见例如,Klagsbrun和D′Amore(Annu.Rev.Physiol.[生理学年评]1991,第53卷:217-39);Streit和Detmar(Oncogene[癌基因]2003,第22卷:3172-3179)(例如,表3列出了恶性黑色素瘤的抗血管生成疗法);Ferrara和Alitalo(Nature Medicine[自然·医学]1999,第5卷(12):1359-1364);Tonini等人(Oncogene[癌基因]2003,第22卷:6549-6556);以及Sato(Int.J.Clin.Oncol.[国际临床肿瘤学杂志]2003,第8卷:200-206;例如,表1列出了临床试验中使用的抗血管生成剂)。

[0136] 如本文所用的“生长抑制剂”是指在体外或体内抑制细胞(如表达VEGF的细胞)的生长的化合物或组合物。因此,生长抑制剂可以是显著减少S期细胞(如表达VEGF的细胞)百分比的药剂。生长抑制剂的示例包括但不限于阻断细胞周期进程(在S期以外的地方)的药剂,如诱导G1停滞和M期停滞的药剂。经典M期阻断剂包括长春花碱(vinca)(长春新碱和长春碱(vinblastine))、紫杉烷和拓扑异构酶II抑制剂,如多柔比星、表柔比星、道诺霉素、依托泊苷和博来霉素。使G1停滞的那些药剂也引起S期停滞,例如DNA烷化剂,如他莫昔芬、强

的松、达卡巴嗪、氮芥、顺铂、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶和ara-C。进一步的信息可见于Mendelsohn和Israel编辑,The Molecular Basis of Cancer[癌症的分子基础],第1章,由Murakami等人撰写的标题为"Cell cycle regulation,oncogenes,and antineoplastic drugs[细胞周期调节,癌基因和抗肿瘤药物]"(W.B.Saunders[W.B.桑德斯出版社],费城,1995),例如第13页。紫杉烷(紫杉醇和多西他赛)是都源自紫杉树的抗癌药物。源自欧洲紫衫的多西他赛(罗纳布朗克罗莱尔公司)是紫杉醇的半合成类似物(百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb))。紫杉醇和多西他赛促进从微管蛋白二聚体组装微管,并且通过防止解聚而稳定微管,从而抑制细胞中的有丝分裂。

[0137] 术语"抗肿瘤组合物"是指可用于治疗癌症的包含至少一种活性治疗剂的组合物。治疗剂的示例包括但不限于例如化学治疗剂、生长抑制剂、细胞毒性剂、在放射疗法中使用的药剂、抗血管生成剂、癌症免疫治疗剂(也称为免疫肿瘤剂)、凋亡剂、抗微管蛋白剂和治疗癌症的其他药剂,如抗HER-2抗体、抗CD20抗体、表皮生长因子受体(EGFR)拮抗剂(例如,酪氨酸激酶抑制剂)、HER1/EGFR抑制剂(例如,厄洛替尼)、血小板源性生长因子抑制剂(例如,甲磺酸伊马替尼)、COX-2抑制剂(例如,塞来昔布)、干扰素、CTLA4抑制剂(例如,抗-CTLA抗体伊匹单抗)、PD-1抑制剂(例如,抗PD1抗体,BMS-936558)、PDL1抑制剂(例如,抗PDL1抗体,MPDL3280A)、PDL2抑制剂(例如,抗PDL2抗体)、VISTA抑制剂(例如,抗VISTA抗体)、细胞因子、与以下靶点(ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR-β、BlyS、APRIL、BCMA、PD-1、PDL1、PDL2、CTLA4、VISTA或VEGF受体)中的一种或多种结合的拮抗剂(例如,中和抗体)、TRAIL/Apo2以及其他生物活性和有机化学药剂等。其组合也包括在本发明中。

[0138] "检查点抑制剂疗法"是当前使用影响免疫系统功能的免疫检查点的癌症治疗形式。免疫检查点可以是刺激性的或抑制性的。肿瘤可以使用这些检查点来保护自己免受免疫系统攻击。检查点疗法可以阻断抑制性检查点,恢复免疫系统功能。检查点蛋白包括程序性细胞死亡1蛋白(PDCD1、PD-1;也称为CD279)及其配体PD-1配体1(PD-L1、CD274)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)、A2AR(腺苷A2A受体)、B7-H3(或CD276)、B7-H4(或VTCN1)、BTLA(B和T淋巴细胞弱化因子或CD272)、IDO(吲哚胺2,3-双加氧酶)、KIR(杀伤细胞免疫球蛋白样受体)、LAG3(淋巴细胞激活基因-3)、TIM-3(T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域分子3)和VISTA(T细胞激活的V结构域Ig抑制因子)。

[0139] 程序性细胞死亡蛋白1(也称为PD-1和CD279(分化簇279))是在通过抑制T细胞炎性活性而下调免疫系统并促进自身耐受方面发挥重要作用的细胞表面受体。PD-1是免疫检查点,并且通过促进淋巴结中抗原特异性T细胞的凋亡(细胞程序性死亡)同时减少调节性T细胞(抗炎、抑制性T细胞)的凋亡的双重机制来防止自身免疫。

[0140] PD-1具有两种配体,即PD-L1和PD-L2,它们是B7家族的成员。PD-L1蛋白在巨噬细胞和树突细胞(DC)上响应于LPS和GM-CSF处理而上调,并且在T细胞和B细胞上在TCR和B细胞受体信号传导时上调,而在静息小鼠中,可以在心、肺、胸腺、脾和肾中检测到PD-L1 mRNA。在用IFN-γ处理后,PD-L1在几乎所有鼠肿瘤细胞系(包括PA1骨髓瘤、P815肥大细胞瘤和B16黑色素瘤)上表达。PD-L2表达更受限制,并且主要由DC和一些肿瘤系表达。

[0141] CTLA4或CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4)(也称为CD152(分化簇152))是充当免疫检查点下调免疫应答的蛋白质受体。CTLA4在调节性T细胞中组成型地表达,但是在激活后仅在传统T细胞中上调-这种现象在癌症中特别值得注意。CTLA4是免疫球蛋白超家

族的成员,它由激活的T细胞表达并且将抑制信号传递给T细胞。CTLA4与T细胞共刺激蛋白CD28同源,并且两种分子都与抗原呈递细胞上的CD80和CD86(也分别称为B7-1和B7-2)结合。CTLA-4结合CD80和CD86的亲和力和亲合力大于结合CD28的亲和力和亲合力,因此与其配体相比,使它能够竞争胜过CD28。CTLA4将抑制信号传递给T细胞,而CD28传递刺激信号。CTLA4也在调节性T细胞中被发现,并且有助于其抑制功能。通过T细胞受体和CD28实现的T细胞激活导致CTLA-4表达增加。

[0142] 有几种当前用于治疗癌症的检查点抑制剂。PD-1抑制剂包括帕博利珠单抗(Keytruda)和纳武利尤单抗(Opdivo)。PD-L1抑制剂包括阿替利珠单抗(Tecentriq)、阿维鲁单抗(Avelumab)(Bavencio)和度伐利尤单抗(Durvalumab)(Imfinzi)。CTLA-4抑制剂包括伊匹木单抗(Iplimumab)(Yervoy)。有几种正在开发的其他检查点抑制剂,包括抗B7-H3抗体(MGA271)、抗KIR抗体(利瑞鲁单抗(Lirilumab))和抗LAG3抗体(BMS-986016)。

[0143] 在另外的实施方案中,本发明提供了多核苷酸,该多核苷酸编码本文所述的抗体或其抗原结合片段中的任一种的重链或轻链或其抗原结合部分。

[0144] 本发明还提供了核酸分子,这些核酸分子包含编码本文所述的抗体(如抗CCR8抗体)的一条或多条链的多核苷酸。在一些实施方案中,核酸分子包含编码本文所述的抗体的重链或轻链的多核苷酸。在一些实施方案中,核酸分子既包含编码本文所述的抗体的重链的多核苷酸又包含编码本文所述的抗体的轻链的多核苷酸。在一些实施方案中,第一核酸分子包含编码重链的第一多核苷酸,并且第二核酸分子包含编码轻链的第二多核苷酸。

[0145] 在一些这样的实施方案中,重链和轻链从一个核酸分子表达,或者从两个单独的核酸分子表达为两个单独的多肽。在一些实施方案中,如当抗体是scFv时,单个多核苷酸编码包含连接在一起的重链和轻链二者的单个多肽。

[0146] 在一些实施方案中,编码本文所述的抗体的重链或轻链的多核苷酸包含编码前导序列的核苷酸序列,该前导序列在翻译时位于重链或轻链的N末端。如上所讨论,前导序列可以是天然的重链或轻链的前导序列,或者可以是另一种异源前导序列。

[0147] 如本文所用,术语“核酸”或“寡核苷酸”是指多核苷酸,如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)。核酸包括但不限于基因组DNA、cDNA、mRNA、iRNA、miRNA、tRNA、ncRNA、rRNA以及重组产生的和化学合成的分子,如适配体、质粒、反义DNA链、shRNA、核酶、缀合的核酸和寡核苷酸。根据本发明,核酸可以作为单链或双链的线性或共价环状封闭的分子存在。核酸可以是分离的。术语“分离的核酸”意指核酸(i)例如经由聚合酶链式反应(PCR)在体外扩增,(ii)通过克隆重组产生,(iii)例如通过切割和凝胶电泳分离而纯化,(iv)例如通过化学合成而合成,或(v)从样品中提取。核酸可以用于引入细胞中(即转染细胞),特别地以RNA的形式,它可以通过体外转录从DNA模板制备。此外,RNA可以在应用前通过稳定序列、加帽和多腺苷酸化来修饰。

[0148] 在一个实施方案中,本发明提供了载体,该载体包含本文所述的多核苷酸,其中载体是选自由以下构成的组的表达载体:哺乳动物表达载体、酵母表达载体、昆虫表达载体以及细菌表达载体。

[0149] 提供了载体,这些载体包含编码本文所述抗体的重链和/或轻链的多核苷酸。这样的载体包括但不限于DNA载体、噬菌体载体、病毒载体、逆转录病毒载体等。在一些实施方案中,载体包含编码重链的第一多核苷酸序列和编码轻链的第二多核苷酸序列。在一些实施

方案中,重链和轻链从载体表达为两个单独的多肽。在一些实施方案中,诸如例如当抗体是scFv时,重链和轻链表达为单个多肽的一部分。

[0150] 在一些实施方案中,第一载体包含编码重链的多核苷酸,并且第二载体包含编码轻链的多核苷酸。在一些实施方案中,将第一载体和第二载体以类似的量(如类似的摩尔量或类似的质量量)转染到宿主细胞中。在一些实施方案中,将摩尔比率或质量比率在5:1与1:5之间的第一载体和第二载体转染到宿主细胞中。在一些实施方案中,对于编码重链的载体和编码轻链的载体,使用在1:1与1:5之间的质量比率。在一些实施方案中,对于编码重链的载体和编码轻链的载体,使用1:2的质量比率。

[0151] 在一些实施方案中,选择被优化以用于在CHO或CHO源性细胞或在NSO细胞中表达多肽的载体。示例性的这样的载体描述于例如Running Deer等人,Biotechnol.Prog.[生物技术进展]20:880-889(2004)中。在一些实施方案中,选择用于在动物(包括人)中体内表达CCR8拮抗剂的载体。在一些这样的实施方案中,一种或多种多肽的表达在以组织特异性方式起作用的一种或多种启动子的控制下。例如,肝特异性启动子描述于例如PCT公开号WO 2006/076288中。

[0152] 术语“载体”、“表达载体”或“质粒DNA”在本文中用于指代通过人为干预操纵的重组核酸构建体。重组核酸构建体可以含有两个或更多个核苷酸序列,它们以使得产物在自然界的细胞中未发现的方式连接。特别地,两个或更多个核苷酸序列可以可操作地连接,如编码目的蛋白质、一种或多种蛋白质标签、功能结构域等的基因。

[0153] 适合用于在制备蛋白质和/或蛋白质缀合物中使用的载体包括选自以下的那些载体:杆状病毒、噬菌体、质粒、噬菌粒、黏粒、F黏粒、细菌人工染色体、病毒DNA、基于P1的人工染色体、酵母质粒和酵母人工染色体。例如,病毒DNA载体可以选自牛痘、腺病毒、鸡(foul)痘病毒、伪狂犬病病毒和SV40衍生物。一种类型的载体是基因组整合载体或可以整合到宿主细胞的染色体DNA中的“整合载体”。另一种类型的载体是附加型载体,例如能够染色体外复制的核酸。能够指导它们可操作地连接的基因的表达的载体在本文中被称为“表达载体”。病毒载体包括腺病毒、腺相关病毒(AAV)、逆转录病毒、慢病毒、痘苗病毒、麻疹病毒、疱疹病毒和牛乳头瘤病毒载体(关于病毒和非病毒载体的综述,参见Kay等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]94:12744-12746(1997))。修饰病毒载体,使得病毒的天然嗜性和致病性已经改变或去除。还可以修饰病毒的基因组以增加其感染性并且适应编码目的多肽的核酸的包装。

[0154] 可以将本发明的核酸构建体引入要改变的细胞中,从而允许嵌合蛋白在细胞内表达。多种方法是本领域已知的并且适合于将核酸引入细胞中,包括病毒和非病毒介导的技术。典型的非病毒介导的技术的示例包括但不限于电穿孔、磷酸钙介导的转移、核转染、声致穿孔(sonoporation)、热休克、磁转染、脂质体介导的转移、显微注射、微粒介导的转移(纳米颗粒)、阳离子聚合物介导的转移(DEAE-葡聚糖、聚乙烯亚胺、聚乙二醇(PEG)等)或细胞融合。其他转染方法包括专有转染试剂,如Lipofectamine™、Dojindo Hilymax™、Fugene™、jetPEI™、Effectene™和DreamFect™。

[0155] 可以将本发明的核酸构建体引入要改变的宿主细胞中,从而允许嵌合蛋白在细胞内表达。多种宿主细胞是本领域已知的并且适合于嵌合蛋白表达。用于转染的典型细胞的示例包括但不限于细菌细胞、真核细胞、酵母细胞、昆虫细胞或植物细胞。例如,大肠杆菌、

芽孢杆菌属、链霉菌属、巴斯德毕赤酵母、鼠伤寒沙门氏菌、果蝇S2、灰翅夜蛾SJ9、CHO、COS(例如,COS-7)、3T3-F442A、HeLa、HUVEC、HUAEC、NIH 3T3、Jurkat、293、293H或293F。

[0156] 在各种实施方案中,本文所述抗体的重链和/或轻链可以在原核细胞(如细菌细胞)中表达;或者在真核细胞(如真菌细胞(如酵母)、植物细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞)中表达。这种表达可以例如根据本领域已知的程序进行。可以用于表达多肽的示例性真核细胞包括但不限于COS细胞,包括COS 7细胞;293细胞,包括293-6E细胞;CHO细胞,包括CHO-S和DG44细胞;PER.C6®细胞(库赛尔公司(Crucell));以及NSO细胞。在一些实施方案中,本文所述抗体的重链和/或轻链可以在酵母中表达。参见例如,美国公开号US2006/0270045A1。在一些实施方案中,基于其对抗CCR8抗体的重链和/或轻链进行所需翻译后修饰的能力来选择特定真核宿主细胞。例如,在一些实施方案中,CHO细胞所产生的多肽的唾液酸化水平高于293细胞中产生的相同多肽的唾液酸化水平。

[0157] 在本文的各种实施方案中,本发明的抗CCR8单克隆抗体在岩藻糖基化受到限制或不存在的细胞中表达,从而产生具有增加的去岩藻糖基化的抗体。在一些方面,抗体选自(a)具有包含SEQ ID NO:3的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链的抗体;(b)具有包含SEQ ID NO:4的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链的抗体;(c)具有包含SEQ ID NO:5的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链的抗体;(d)具有包含SEQ ID NO:6的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链的抗体;(e)具有包含SEQ ID NO:7的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链的抗体;(f)具有包含SEQ ID NO:8的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链的抗体;(h)具有包含SEQ ID NO:9的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链的抗体,其中抗体特异性结合CCR8。在优选方面,抗体是具有包含SEQ ID NO:6的重链和包含SEQ ID NO:2的轻链的抗体。在这些实施方案中,抗体具有至少50%的去岩藻糖基化水平。例如,抗体具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的去岩藻糖基化水平。

[0158] 可以通过任何方法将一种或多种核酸引入所需宿主细胞中,包括但不限于磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染等。非限制性示例性方法描述于例如Sambrook等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第3版Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社](2001)中。可以根据任何合适的方法在所需宿主细胞中瞬时地或稳定地转染核酸。

[0159] 在一些实施方案中,一种或多种多肽可以根据任何合适的方法在已经用编码多肽的一种或多种核酸分子工程化或转染的动物体内产生。

[0160] 多核苷酸可以在载体(例如,表达载体)中递送到细胞(例如,包含靶细胞或细胞类型和/或非靶细胞类型的多个不同的细胞或细胞类型)中。载体的示例包括但不限于(a)非病毒载体,如核酸载体,包括线性寡核苷酸和环状质粒;人工染色体,如人类人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)和细菌人工染色体(BAC或PAC);附加型载体;转座子(例如,PiggyBac);以及(b)病毒载体,如逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和AAV载体。病毒载体具有用于递送核酸的几个优点,包括对于某些靶细胞或组织的高感染性和/或嗜性。在一些情况下,病毒载体可以用于递送本文所述的多核苷酸。

[0161] 另外的实施方案

[0162] 实施方案1.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR

CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSEQQYYYAMDY(SEQ ID NO:19)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8。

[0163] 实施方案2.如实施方案1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段进一步包含SEQ ID NO:23的HFR1序列、SEQ ID NO:24的HFR2序列、SEQ ID NO:25的HFR3序列和/或SEQ ID NO:26的HFR4序列。

[0164] 实施方案3.如实施方案1或2所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段进一步包含SEQ ID NO:27的LFR1序列、SEQ ID NO:28的LFR2序列、SEQ ID NO:29的LFR3序列和/或SEQ ID NO:30的LFR4序列。

[0165] 实施方案4.如实施方案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,其中该HCVR序列是SEQ ID NO:36和/或该LCVR序列是SEQ ID NO:32。

[0166] 实施方案5.如实施方案1-4中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该HCVR序列是SEQ ID NO:36并且该LCVR序列是SEQ ID NO:32。

[0167] 实施方案6.如实施方案1-5中任一项所述的分离的单克隆抗体,其中该重链序列是SEQ ID NO:6并且该轻链序列是SEQ ID NO:2。

[0168] 实施方案7.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(a)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSEQNYYYAMDY(SEQ ID NO:16)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(b)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSENNYYYAMDY(SEQ ID NO:17)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(c)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSENQYYYAMDY(SEQ ID NO:18)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(d)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSDQNYYYAMDY(SEQ ID NO:20)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(e)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID

NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSDNQYYYAMDY(SEQ ID NO:21)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列;或(f)HCVR,该HCVR包含具有氨基酸序列GFRFNTNA(SEQ ID NO:10)的HCVR CDR1序列、具有氨基酸序列IRSKSNSYATYY(SEQ ID NO:11)的HCVR CDR2序列和具有氨基酸序列TRGSDQQYYYAMDY(SEQ ID NO:22)的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含具有氨基酸序列QSLLHSNGNTY(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列、具有氨基酸序列YRMSNR(SEQ ID NO:14)的LCVR CDR2序列和具有氨基酸序列MQHLEYPFT(SEQ ID NO:15)的LCVR CDR3序列,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8。

[0169] 实施方案8.如实施方案7所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段进一步包含SEQ ID NO:23的HFR1序列、SEQ ID NO:24的HFR2序列、SEQ ID NO:25的HFR3序列和/或SEQ ID NO:26的HFR4序列。

[0170] 实施方案9.如实施方案7或8所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段进一步包含SEQ ID NO:27的LFR1序列、SEQ ID NO:28的LFR2序列、SEQ ID NO:28的LFR3序列和/或SEQ ID NO:29的LFR4序列。

[0171] 实施方案10.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(a)SEQ ID NO:33的HCVR序列和SEQ ID NO:32的LCVR序列;或(b)SEQ ID NO:34的HCVR序列和SEQ ID NO:32的LCVR序列;或(c)SEQ ID NO:35的HCVR序列和SEQ ID NO:32的LCVR序列;或(d)SEQ ID NO:37的HCVR序列和SEQ ID NO:32的LCVR序列;或(e)SEQ ID NO:38的HCVR序列和SEQ ID NO:32的LCVR序列;或(f)SEQ ID NO:39的HCVR序列和SEQ ID NO:32的LCVR序列,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8。

[0172] 实施方案11.一种分离的单克隆抗体,该分离的单克隆抗体包含(a)SEQ ID NO:3的重链序列和SEQ ID NO:2的轻链序列;或(b)SEQ ID NO:4的重链序列和SEQ ID NO:2的轻链序列;或(c)SEQ ID NO:5的重链序列和SEQ ID NO:2的轻链序列;或(d)SEQ ID NO:7的重链序列和SEQ ID NO:2的轻链序列;或(e)SEQ ID NO:8的重链序列和SEQ ID NO:2的轻链序列;或(f)SEQ ID NO:9的重链序列和SEQ ID NO:2的轻链序列,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8。

[0173] 实施方案12.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段与如实施方案5、6、10或11中任一项所述的抗体具有至少80%同一性,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合CCR8。

[0174] 实施方案13.如实施方案1-12中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该抗体是人源化抗体。

[0175] 实施方案14.如实施方案1-13中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中其抗原结合片段是Fab、Fab'、F(ab')2、Fd、单链Fv或scFv、二硫键连接的Fv、V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、IgGACH2、微型抗体、F(ab')3、四抗体、三抗体、双抗体、结构域抗体(dAb)、DVD-Ig、Fcab、mAb2、(scFv)2、串联scFv、DART®、TandAb、纳米抗体或scFv-Fc。

[0176] 实施方案15.如实施方案1-14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以小于约25nM、20nM、15nM、10nM、5nM、2nM、1nM、0.5nM或0.01nM的Kd结合人CCR8。

[0177] 实施方案16.如实施方案1-15中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段诱导ADCC。

[0178] 实施方案17.如实施方案1-16中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该抗体具有至少50%的去岩藻糖基化水平。

[0179] 实施方案18.如实施方案1-17中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该抗体具有至少85%的去岩藻糖基化水平。

[0180] 实施方案19.一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施方案1-18中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,从而治疗该受试者的癌症。

[0181] 实施方案20.一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施方案1-18中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段以及抗癌剂,从而治疗该受试者的癌症。

[0182] 实施方案21.如实施方案19或20所述的方法,其中该癌症是血液癌症或实体瘤。

[0183] 实施方案22.如实施方案21所述的方法,其中该血液癌症选自由以下构成的组:急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病以及毛细胞白血病、艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样肉芽肿病、非霍奇金淋巴瘤、原发中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)以及多发性骨髓瘤。

[0184] 实施方案23.如实施方案21所述的方法,其中该实体瘤是乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结肠癌、肾癌、卵巢癌、肝癌或前列腺癌。

[0185] 实施方案24.如实施方案19所述的方法,该方法进一步包括向该患者施用抗癌剂。

[0186] 实施方案25.如实施方案20或24所述的方法,其中该抗癌剂是化学治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂、检查点抑制剂和/或抗肿瘤组合物。

[0187] 实施方案26.一种治疗有需要的受试者的乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结肠癌、肾癌、卵巢癌、肝癌和/或前列腺癌的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施方案1-18中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,从而治疗该受试者的癌症。

[0188] 实施方案27.一种治疗有需要的受试者的乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结肠癌、肾癌、卵巢癌、肝癌和/或前列腺癌的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施方案1-18中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段以及抗癌剂,从而治疗该受试者的癌症。

[0189] 实施方案28.如实施方案27所述的方法,其中该抗癌剂是化学治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂、检查点抑制剂和/或抗肿瘤组合物。

[0190] 实施方案29.一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施方案1-6中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,从而治疗该受试者的癌症。

[0191] 实施方案30.一种治疗有需要的受试者的乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结肠癌、肾癌、卵巢癌、肝癌和/或前列腺癌的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施方案1-6中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,从而治疗

该受试者的癌症。

[0192] 实施方案31.一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施方案1-6中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段以及抗癌剂,从而治疗该受试者的癌症。

[0193] 实施方案32.一种治疗有需要的受试者的乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结肠癌、肾癌、卵巢癌、肝癌和/或前列腺癌的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施方案1-6中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段以及抗癌剂,从而治疗该受试者的癌症。

[0194] 实施方案33.如实施方案29或31所述的方法,其中该癌症是血液癌症或实体瘤。

[0195] 实施方案34.如实施方案33所述的方法,其中该血液癌症选自由以下构成的组:急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病以及毛细胞白血病、艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样肉芽肿病、非霍奇金淋巴瘤、原发中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)以及多发性骨髓瘤。

[0196] 实施方案35.如实施方案33所述的方法,其中该实体瘤是乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结肠癌、肾癌、卵巢癌、肝癌或前列腺癌。

[0197] 实施方案36.如实施方案29或30所述的方法,该方法进一步包含向该患者施用抗癌剂。

[0198] 实施方案37.如实施方案36所述的方法,其中该抗癌剂是化学治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂、检查点抑制剂和/或抗肿瘤组合物。

[0199] 实施方案38.一种多核苷酸,该多核苷酸编码如实施方案1-18中任一项所述的重链或轻链或其抗原结合部分。

[0200] 实施方案39.一种载体,该载体包含如实施方案38所述的多核苷酸,其中该载体是选自由以下构成的组的表达载体:哺乳动物表达载体、酵母表达载体、昆虫表达载体以及细菌表达载体。

[0201] 实施方案40.一种产生如实施方案6或11所述的单克隆抗体的方法,其中该抗体被去岩藻糖基化至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%,该方法包含在经工程化以减少或防止该抗体的岩藻糖基化的细胞中表达该抗体的多核苷酸的表达。

[0202] 以下呈现的是讨论如本文所述的分离的抗CCR8抗体的实施例。提供以下实施例以进一步说明本发明的实施方案,但不旨在限制本发明的范围。虽然它们是可以使用的那些中的典型,但可以可替代地使用本领域技术人员已知的其他程序、方法或技术。

[0203] 实施例

[0204] 实施例1

[0205] 人源化抗CCR8抗体去岩藻糖基化

[0206] 为了评估去岩藻糖基化水平对Ab001_WT抗体特性的影响,在细胞系产生期间应用阿图姆公司(ATUM)的专有低岩藻糖基化(hypofucosylation)技术(miFuc™)以将去岩藻糖基化水平增加至>90%。具有相同序列但未采用miFuc™低岩藻糖基化技术的第二比较细胞系产生大约11%的去岩藻糖基化。采用HuT78细胞报告物测定使用Jurkat-CD16A-NFAT来评价抗体的ADCC效力。观察到低岩藻糖基化细胞系相对于非低岩藻糖基化细胞系的ADCC活性

增加大约100倍(参见表1和图1)。

[0207] 表1:采用Hut78靶细胞的ADCC报告物测定EC50结果

[0208]

样品	EC50 (ng/ml)	EC50 (pM)
Ab001_WT	10.6	71
Ab001_WT_F	1153	7687

[0209] 实施例2

[0210] CCR8结合测定

[0211] 如下使用CHO-K1人趋化因子CCR8受体细胞系(CHO.hCCR8;珀金埃尔默公司(Perkin Elmer Corp.),马萨诸塞州沃尔瑟姆)测试抗体与CCR8的结合。将大约5x10^{4}个CHO.hCCR8细胞在V型底96孔板的孔中重悬于冷MACS缓冲液(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec,Inc.),加利福尼亚州圣何塞)中的50μL连续稀释的抗体(抗体浓度为10、3.3、1.1、0.37、0.12、0.04和0.01nM)中。在冰上孵育30min后,向每个孔中添加150μL冷MACS缓冲液,将板在4℃下以500xg离心5min,并且丢弃上清液。将细胞在200μL冷MACS缓冲液中洗涤两次,然后重悬于在MACS缓冲液中以1:100稀释的50μL抗人IgG-Alexa Fluor 488(杰克逊实验室(The Jackson Laboratory),缅因州巴尔港)中。在冰上孵育30min后,向每个孔中添加150μL冷MACS缓冲液,将板在4℃下以500xg离心5min,并且丢弃上清液。将细胞在200μL冷MACS缓冲液中洗涤两次,然后重悬于具有碘化丙锭(PI,1:1000稀释度,1μg/ml;赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific),马萨诸塞州沃尔瑟姆)的80μL冷MACS缓冲液中。使用CellStream流式细胞术系统(厦泰生物科技公司(Cytek Biosciences),加利福尼亚州弗里蒙特)测量抗体结合(发光)。

[0212] 实施例3

[0213] 抗体依赖的细胞毒性(ADCC)测定

[0214] 将CHO.hCCR8细胞以1x10^{4}个细胞/孔的密度接种在白色透明底96孔板中的100μLHam's F-12培养基(10% FBS,0.4mg/mL G418)中。在24小时后,去除培养基,并且添加40μL的测定培养基(一步式萤光素酶测定系统;BPS生物科学公司(BPS Bioscience)加利福尼亚州圣地亚哥)。在测定培养基中,将抗体以1:10稀释,然后以1:4连续稀释,并且将10μL的每份分配至孔中并且孵育1小时。以5x10^{4}个细胞/孔以50μL等分样品向每个孔中添加ADCC生物测定效应细胞V变体(高亲和力)-Jurkat重组细胞系(BPS生物科学公司)细胞。将板在37℃、5% CO_2下孵育5小时,然后添加100μL萤光素酶测定工作溶液(在萤光素酶试剂缓冲液中以1:100稀释的萤光素酶试剂底物;BPS生物科学公司),并且在室温下将板轻轻摇动20分钟。然后使用光度计测量发光。

[0215] 实施例4

[0216] AB001_WT抗体的脱酰胺

[0217] 将Ab001_Wt在37℃下在pH 7.4的PBS中孵育,并且在0、1、4、7、14、21和28天收集样品。测定样品在每个时间点的人CCR8结合EC_{50}、ADCC EC_{50}以及N104和/或N105处的脱酰胺百分比。如图2A和图2B所图示,hCCR8结合和ADCC活性随时间降低。如图2C所图示,观察到的降

低与在同一时间段内Ab001_Wt抗体的脱酰胺一致。这证明Ab001_Wt有随时间降低抗体的有效性的缺陷,并且表明需要抗体的频繁给药以维持Ab001_Wt的活性水平。

[0218] 在第二个实验中,来自猴药代动力学(PK)研究的血浆样品证明CCR8结合(图3A)和ADCC活性(图3B)二者都随时间急剧下降。这证明Ab001_Wt在动物中有相同的缺陷。

[0219] 实施例5

[0220] 突变体抗体的构建和测试

[0221] 修饰Ab001_Wt的HCVR CDR3,以产生一系列脱酰胺敏感性降低的抗体。这些抗体修饰HCVR CDR3序列的氨基酸103至105,从亲本抗体Ab001_Wt中的DNN修饰为Ab001_M1中的EQN、Ab001_M2中的ENN、Ab001_M3中的ENQ、Ab001_M4中的EQQ、Ab001_M5中的DQN、Ab001_M6中的DNQ和Ab001_M7中的DQQ。相对于亲本抗体Ab001_Wt测试突变体抗体的CCR8结合亲和力和ADCC活性。

[0222] 如图4A和图4B所图示,测量Ab001-M1、M2、M3和M4的CCR8结合,并且将其与Ab001_Wt的结合活性进行比较。EC50总结在图4C中。虽然CDR3区的修饰显示出对结合EC_{50}的一些影响,但出人意料地,完全替代Ab001_M4中的天冬酰胺酰基残基N104和N105不产生显著变化。因此,Ab001_M4随时间去除脱酰胺的缺陷,并且保留CCR8结合活性。

[0223] 如图5A和图5B所图示,测量Ab001-M1、M2、M3和M4的ADCC活性,并且将其与Ab001_Wt的ADCC活性进行比较。EC50总结在图5C中。正如CCR8结合所见,虽然CDR3区的修饰显示出对ADCC EC_{50}的一些影响,但出人意料地,完全替代Ab001_M4中的天冬酰胺酰基残基N104和N105不产生显著变化。因此,Ab001_M4随时间去除脱酰胺的缺陷,并且保留ADCC活性。

[0224] 尽管已经参考以上实施例描述了本发明,但将理解,修改和变化涵盖在本发明的精神和范围内。因此,本发明仅由以下权利要求限定。

[0225] 序列:

[0226] 加下划线:信号序列

[0227] **加方格**:突变

[0228] >Ab001_WT HC(野生型)(SEQ ID NO:1)

MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSDNNYYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC

[0229] NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0230] >Ab001_WT LC(野生型和以下所有变体)(SEQ ID NO:2)

[0231] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLYWFLQKPGQSPQLLIYR

[0232] MSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL

[0233] KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG

[0234] LSSPVTKSFNRGEC

[0235] >Ab001_M1 HC(EQN)(SEQ ID NO:3)

MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSEQNYYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC

[0236] NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0237] >Ab001_M2 HC(ENN)(SEQ ID NO:4)

MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSENNYYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC

[0238] NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0239] >Ab001_M3 HC(ENQ)(SEQ ID NO:5)

MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSENQYYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC

[0240] NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0241] >Ab001_M4 HC(EQQ)(SEQ ID NO:6)

MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSEQQYYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC

[0242] NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0243] >Ab001_M5 HC(DQN)(SEQ ID NO:7)

MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSDQNYYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC

[0244] NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0245] >Ab001_M6 HC(DNQ)(SEQ ID NO:8)

MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSDNQYYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC

[0246] NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0247] >Ab001_M7 HC(DQQ)(SEQ ID NO:9)

MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSDQQYYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSV

[0248] FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT

[0249] LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0250] >Ab001_WT和M1-M7 HCDR1(SEQ ID NO:10)

[0251] GFRFNTNA

[0252] >Ab001_WT和M1-M7 HCDR2(SEQ ID NO:11)

[0253] IRSKSNSYATYY

[0254] >Ab001_WT HCDR3(SEQ ID NO:12)

[0255] TRGSDNNYYYAMDY

[0256] >Ab001_WT和M1-M7 LCDR1(SEQ ID NO:13)

[0257] QSLLHSNGNTY

[0258] >Ab001_WT和M1-M7 LCDR2(SEQ ID NO:14)

[0259] YRMSNR

[0260] >Ab001_WT和M1-M7 LCDR3(SEQ ID NO:15)

[0261] MQHLEYPFT

[0262] >Ab001_M1 HCDR3(SEQ ID NO:16)

[0263] TRGSEQNYYYAMDY

[0264] >Ab001 M2 HCDR3(SEQ ID NO:17)

[0265] TRGSENNYYYAMDY

[0266] >Ab001 M3 HCDR3(SEQ ID NO:18)

[0267] TRGSENQYYYAMDY

[0268] >Ab001 M4 HCDR3(SEQ ID NO:19)

[0269] TRGSEQQYYYAMDY

[0270] >Ab001 M5 HCDR3(SEQ ID NO:20)

[0271] TRGSDQNYYYAMDY

[0272] >Ab001 M6 HCDR3(SEQ ID NO:21)

[0273] TRGSDNQYYYAMDY

[0274] >Ab001 M7 HCDR3(SEQ ID NO:22)

[0275] TRGSDQQYYYAMDY

[0276] >Ab001 WT和M1-M7 HFR1(SEQ ID NO:23)

[0277] EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS

[0278] >Ab001 WT和M1-M7 HFR2(SEQ ID NO:24)

[0279] MNWVRQASGKDLEWVAR

[0280] >Ab001 WT和M1-M7 HFR3(SEQ ID NO:25)

[0281] AASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYC

[0282] >Ab001 WT和M1-M7 HFR4(SEQ ID NO:26)

[0283] WGQGTTVTVSS

[0284] >Ab001 WT和M1-M7 LFR1(SEQ ID NO:27)

[0285] DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS

[0286] >Ab001 WT和M1-M7 LFR2(SEQ ID NO:28)

[0287] LYWFLQKPGQSPQLLI

[0288] >Ab001 WT和M1-M7 LFR3(SEQ ID NO:29)

[0289] ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC

[0290] >Ab001 WT和M1-M7 LFR4(SEQ ID NO:30)

[0291] FGQGTKLEIK

[0292] >Ab001_WT HCVR(野生型)(SEQ ID NO:31)

[0293] MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSDNNYYYAMDYWGQGTTVTVSS

[0294] >Ab001_WT LCVR(野生型和以下所有变体)(SEQ ID NO:32)

[0295] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLYWFLQKPGQSP
QLLIYRMSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGQGTKLEIK

[0296] >Ab001_M1 HC(EQN)(SEQ ID NO:33)

[0297] MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSEQNYYYAMDYWGQGTTVTVSS

[0298] >Ab001_M2 HC(ENN)(SEQ ID NO:34)

[0299] MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSENNYYYAMDYWGQGTTVTVSS

[0300] >Ab001_M3 HC(ENQ)(SEQ ID NO:35)

[0301] MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSENQYYYAMDYWGQGTTVTVSS

[0302] >Ab001_M4 HC(EQQ)(SEQ ID NO:36)

[0303] MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSEQQYYYAMDYWGQGTTVTVSS

[0304] >Ab001_M5 HC(DQN)(SEQ ID NO:37)

[0305] MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSDQNYYYAMDYWGQGTTVTVSS

[0306] >Ab001_M6 HC(DNQ)(SEQ ID NO:38)

[0307] MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSDNQYYYAMDYWGQGTTVTVSS

[0308] >Ab001_M7 HC(DQQ)(SEQ ID NO:39)

[0309] MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLEWVARIRSKSN
SYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRGSDQQYYYAMDYWGQGTTVTVSS

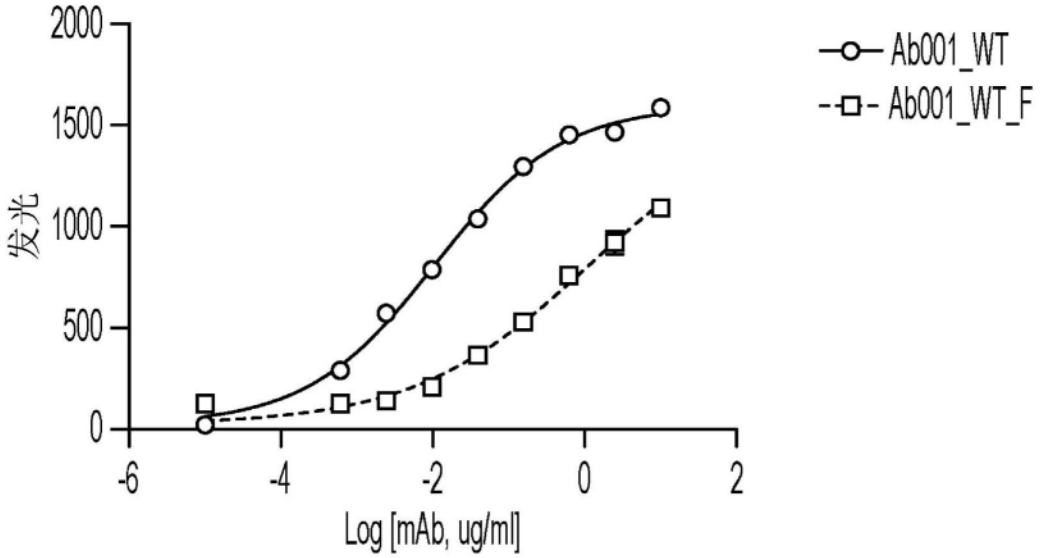
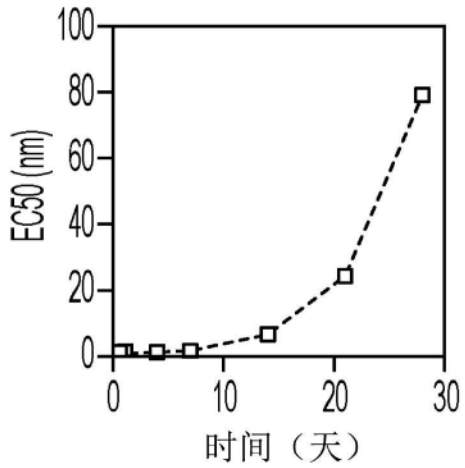
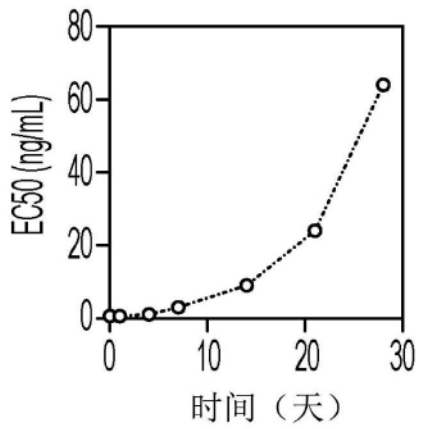


图1



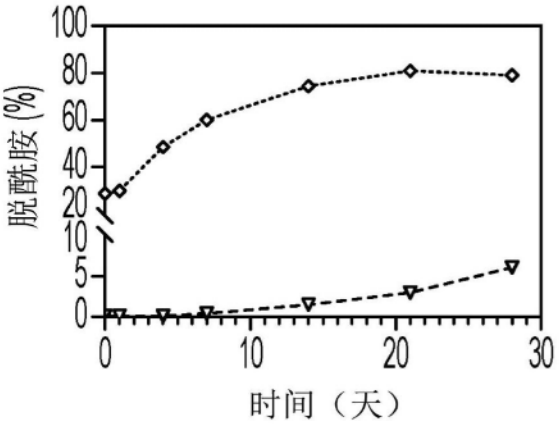
时间（天）	结合测定 EC50 (nM)	倍数变化	残余 Ab001_WT%
0	0.48		100
1	0.68	1.4	71
4	1.25	2.6	38
7	1.67	3.5	30
14	6.65	14	7
21	24.4	36	3
28	79.2	165	0.6

图2A



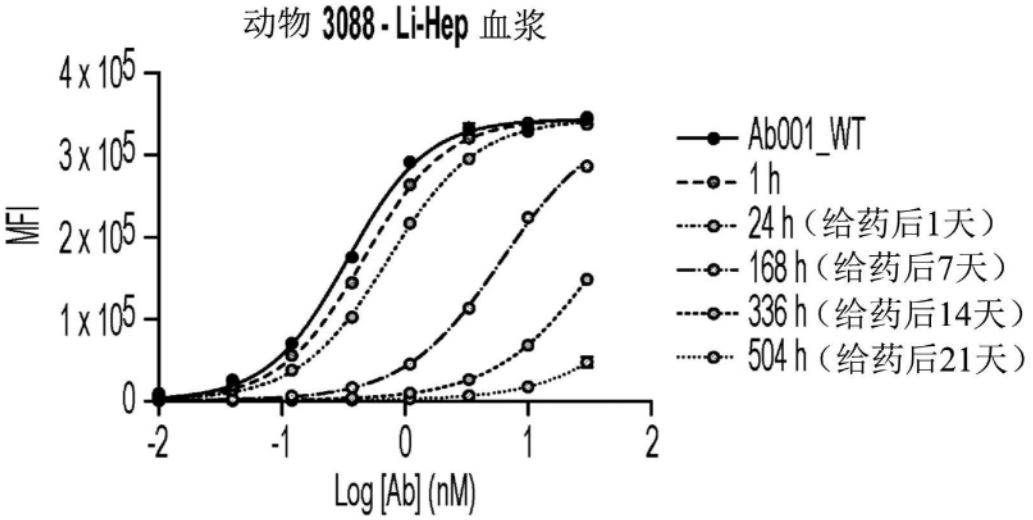
时间（天）	ADCC EC50 (ng/mL)	倍数变化	残余 Ab001_WT%
0	0.66		100
1	0.65	0.98	102
4	1.1	1.67	60
7	3	4.5	22
14	9	14	7
21	25	38	3
28	64	97	1

图2B



时间（天）	N104或N105 脱酰胺%	104 和 105 脱酰胺%	残余 Ab001_WT%
0	25.8	0	74.2
1	29.9	0	70
4	48.6	0	51.4
7	60.1	0.4	39.5
14	74.4	1.5	24.1
21	80.9	3	22.1
28	79	6.1	14.9

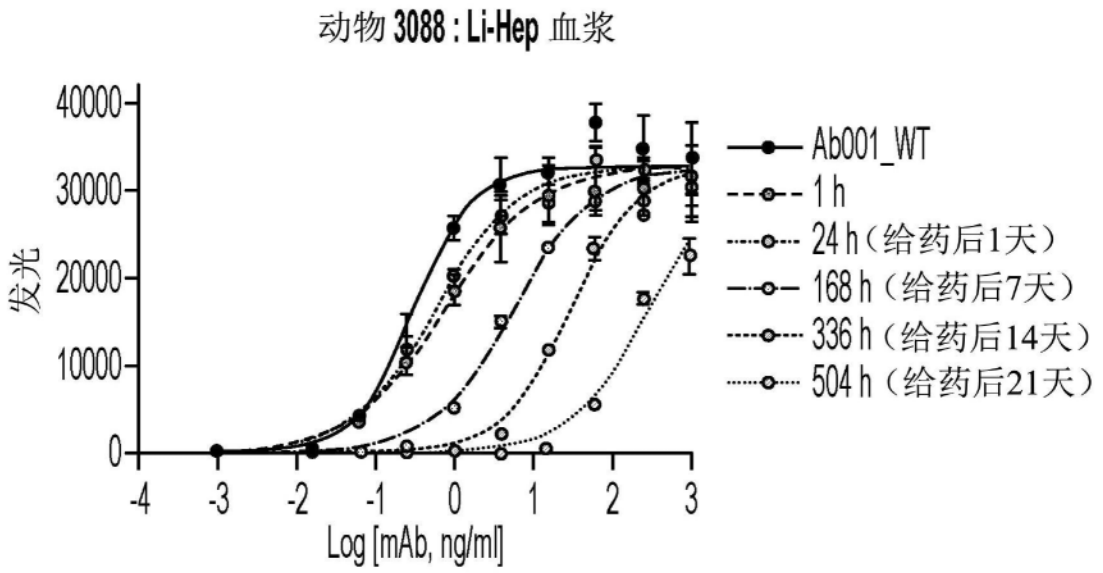
图2C



样品	EC50 (nM)
Ab001_WT	0.34
1 h	0.46
24 h	0.73
168 h	6.16
336 h	39.9
504 h	188.3*

*推测的 EC50-不准确

图3A



样品	EC50 (ng/mL)
Ab001_WT	0.31
1 h	0.75
24 h	0.56
168 h	5.7
336 h	30.4
504 h	301.6

图3B

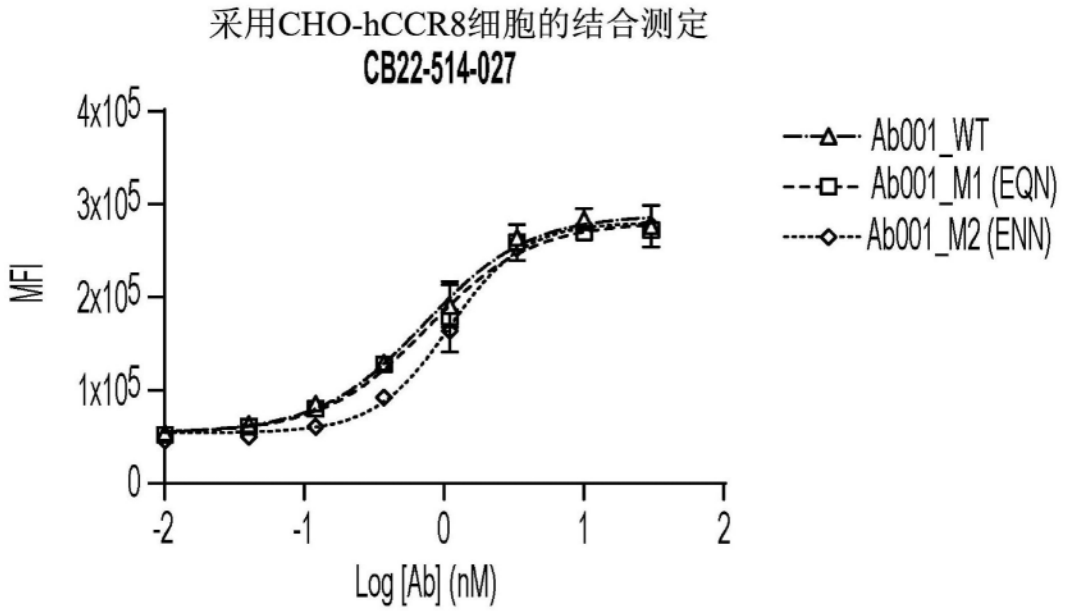

采用CHO-hCCR8细胞的结合测定
CB22-514-027
MFI
4x10^5
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
-2
-1
0
1
2
Log [Ab] (nM)
Ab001_WT
Ab001_M1 (EQN)
Ab001_M2 (ENN)

图4A

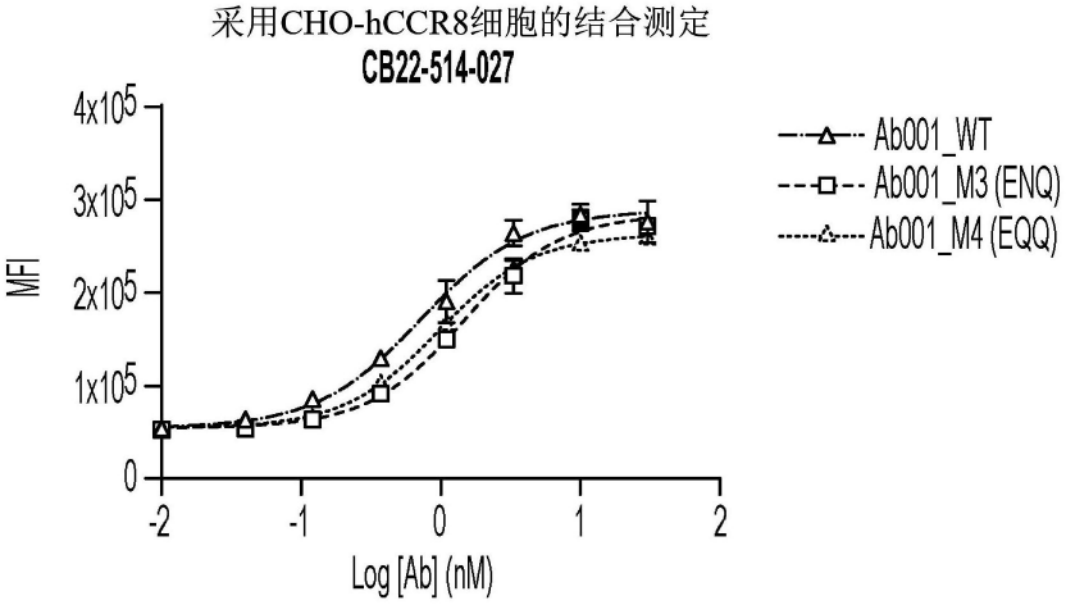

采用CHO-hCCR8细胞的结合测定
CB22-514-027
MFI
4x10^5
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
-2
-1
0
1
2
Log [Ab] (nM)
Ab001_WT
Ab001_M3 (ENQ)
Ab001_M4 (EQQ)

图4B

样品	EC50 (nM)
Ab001_Wt	0.72
Ab001_M1	0.76
Ab001_M2	1.09
Ab001_M3	1.45
Ab001_M4	0.96

图4C

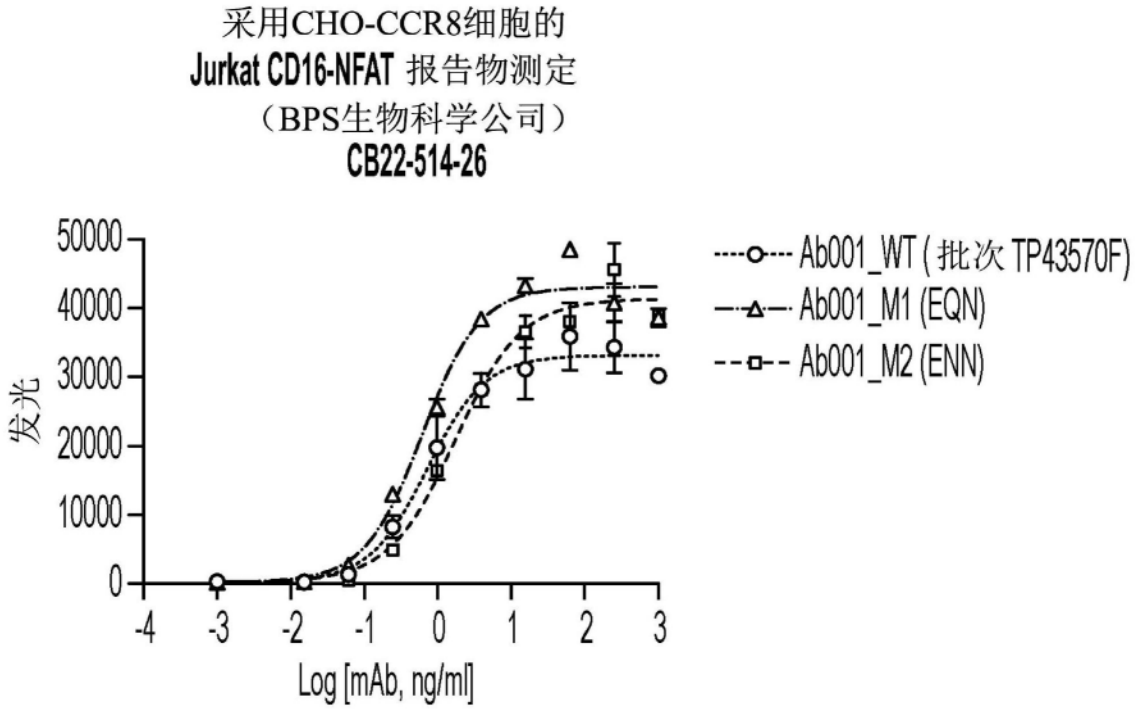


图5A

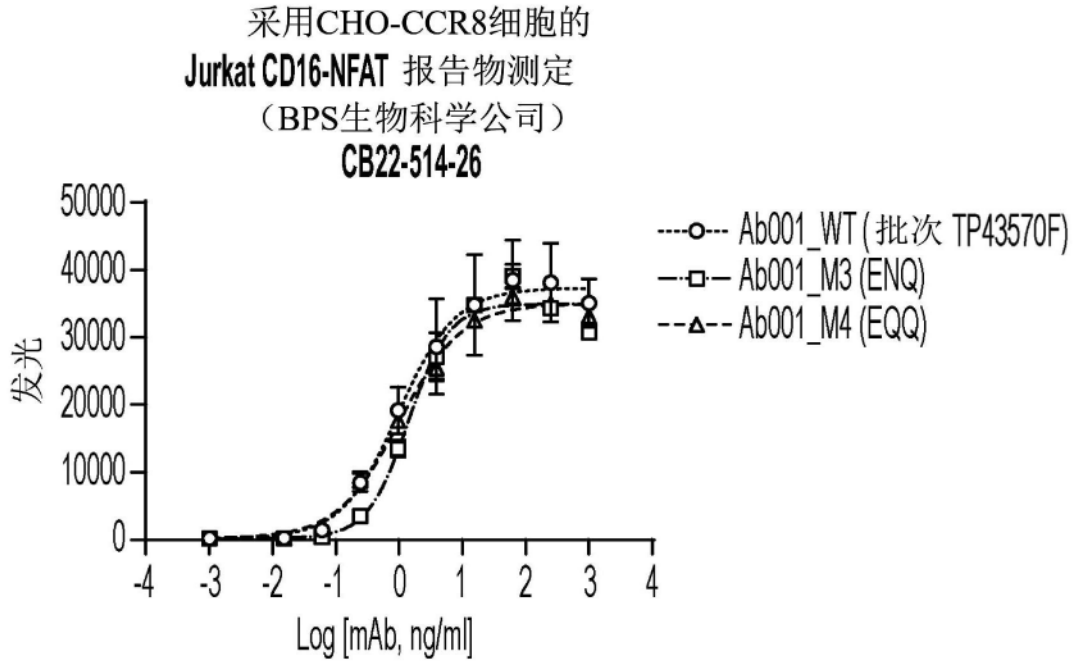


图5B

样品	EC50 (ng/mL)
Ab001_Wt	0.72
Ab001_M1	0.61
Ab001_M2	1.72
Ab001_WT	0.98
Ab001_M3	1.41
Ab001_M4	1.02

图5C