202202521

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202202521 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：110110284 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 03 月 22 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/28 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2020/03/23 美國 62/993,570
2020/06/21 美國 63/041,992
2021/03/05 美國 63/157,618

(71)申請人：美商必治妥美雅史谷比公司 (美國) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (US)
美國

(72)發明人：藍 尹蓉 LAN, RUTH YIN-ZONG (US)；阿德拉昆 甌露菲米 A ADELAKUN, OLUFEMI A. (US)；巴曼 伊希塔 BARMAN, ISHITA (US)；坎貝爾 喬瑟夫 理查 CAMPBELL, JOSEPH RICHARD (US)；芬迪森 菲立克斯 FINDEISEN, FELIX (DE)；格林納瓦 丹尼爾 M GREENAWALT, DANIELLE M. (US)；珍雷努 JAIN, RENU (IN)；加塔基亞 艾咪 D JHATAKIA, AMY D. (US)；李 京元 LEE, JOHN K. (US)；李 彼得 成根 LEE, PETER SUNG KEUN (US)；梁 琳達 LIANG, LINDA (US)；盧 愷 LU, KAI (US)；麥克唐納 布萊恩 MCDONALD, BRYAN (US)；麥斯科 保羅 布雷恩 MESKO, PAUL BLAINE (US)；雷吉帕爾 阿爾文德 RAJPAL, ARVIND (US)；桑巴漢密爾頓 夏米拉 SAMBANTHAMOORTHY, SHARMILA (IN)；賽爾比 馬克 J SELBY, MARK J. (US)；西默斯 強納森 O SIEMERS, NATHAN O. (US)；史特羅普 潘維爾 STROP, PAVEL (US)；特雷西納 加比 A TERRACINA, GABY A. (US)；王希濤 WANG, XI-TAO (US)；張 健哲 DIONG, SJ JIAN ZHE (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：39 項 圖式數：30 共 360 頁

(54)名稱

用於治療癌症之抗 CCR8 抗體

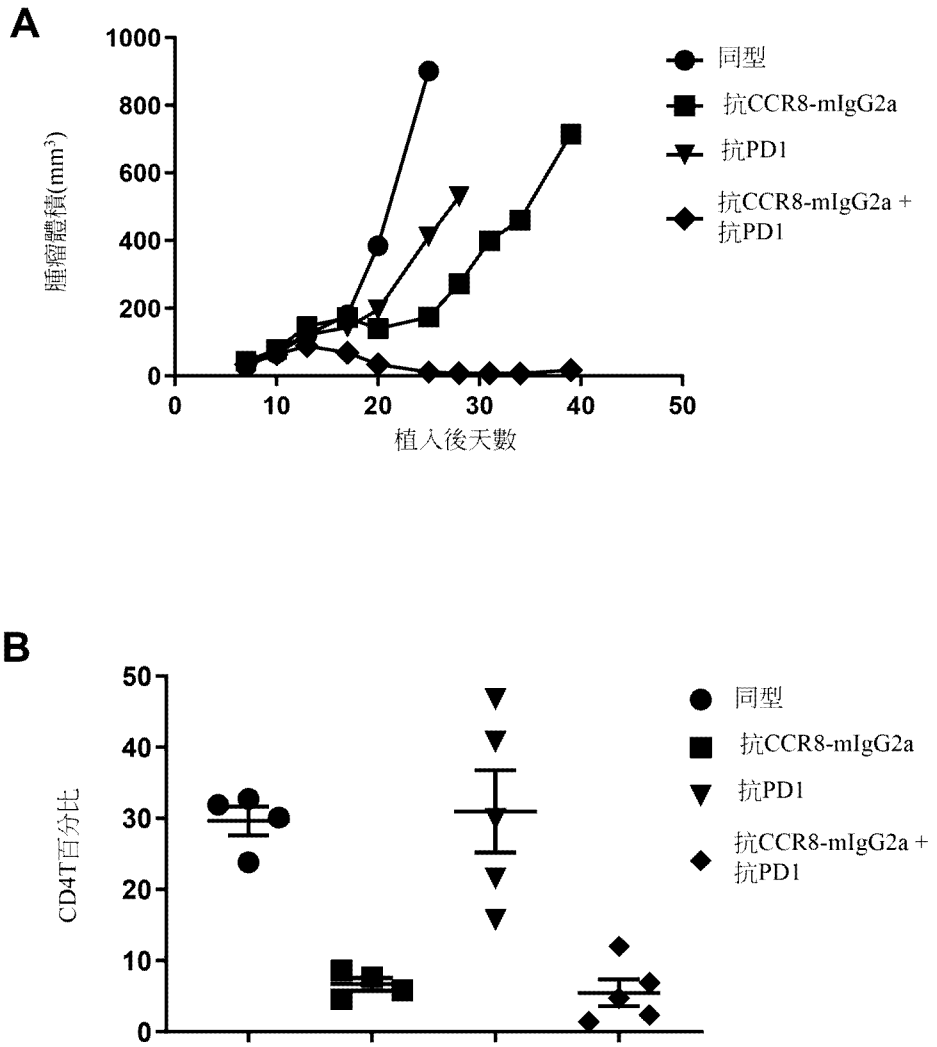
(57)摘要

本發明提供一種經分離之抗體，例如單株抗體，其特異性結合於表現於細胞表面上之 C-C 模體趨化介素受體 8 (CCR8)且藉由抗體依賴性細胞毒性(ADCC)來介導 CCR8 表現細胞之消耗。本發明提供用於治療罹患癌症之個體之方法，其包含以單藥療法或與諸如免疫檢查點抑制劑之抗癌劑之組合形式向個體投與治療有效量之抗 CCR8 抗體，該免疫檢查點抑制劑為例如抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體。

This disclosure provides isolated antibodies, for example, monoclonal antibodies, that specifically bind to the C-C Motif Chemokine Receptor 8 (CCR8) expressed on the surface of a cell and mediate depletion of the CCR8-expressing cell by antibody- dependent cellular cytotoxicity (ADCC). The disclosure provides methods for treating a subject afflicted with a cancer comprising administering to the subject a therapeutically

effective amount of an anti-CCR8 antibody as monotherapy or in combination with an anti-cancer agent such as an immune checkpoint inhibitor, for example, an anti-PD-1 or anti-PD-L1 antibody.

指定代表圖：



【圖25A及25B】

202202521

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於治療癌症之抗CCR8抗體

【英文發明名稱】

ANTI-CCR8 ANTIBODIES FOR TREATING CANCER

【中文】

本發明提供一種經分離之抗體，例如單株抗體，其特異性結合於表現於細胞表面上之C-C模體趨化介素受體8 (CCR8)且藉由抗體依賴性細胞毒性(ADCC)來介導CCR8表現細胞之消耗。本發明提供用於治療罹患癌症之個體之方法，其包含以單藥療法或與諸如免疫檢查點抑制劑之抗癌劑之組合形式向個體投與治療有效量之抗CCR8抗體，該免疫檢查點抑制劑為例如抗PD-1或抗PD-L1抗體。

【英文】

This disclosure provides isolated antibodies, for example, monoclonal antibodies, that specifically bind to the C-C Motif Chemokine Receptor 8 (CCR8) expressed on the surface of a cell and mediate depletion of the CCR8-expressing cell by antibody- dependent cellular cytotoxicity (ADCC). The disclosure provides methods for treating a subject afflicted with a cancer comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an anti-CCR8 antibody as monotherapy or in combination with an anti-cancer agent such as an immune checkpoint inhibitor, for example, an anti-PD-1 or anti-PD-L1 antibody.

【指定代表圖】

圖25A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於治療癌症之抗CCR8抗體

【英文發明名稱】

ANTI-CCR8 ANTIBODIES FOR TREATING CANCER

【技術領域】

【0001】本發明係關於特異性結合於C-C模體趨化介素受體8(CCR8)之經分離之抗體(Ab)，例如單株抗體(mAb)，及用於治療個體中之癌症之方法，其包含以單藥療法或與諸如免疫檢查點抑制劑之抗癌劑之組合形式向個體投與抗CCR8 Ab。

【先前技術】

【0002】人類癌症具有許多遺傳及表觀遺傳改變，產生潛在地可由免疫系統識別之新抗原(Chakravarthi等人, 2016)。利用適應性免疫系統之屬性來治療癌症使得免疫療法因其對許多癌症之適用性及誘導持久的抗腫瘤作用而在所有癌症治療模式中具有獨特性。

【0003】在藉由使用檢查點抑制劑(諸如抗PD-1 Ab、尼沃單抗(nivolumab)(OPDIVO®)及抗CTLA-4 Ab、伊派利單抗(ipilimumab)(YERVOY®)刺激細胞毒性T細胞之活性來治療不同實體腫瘤及血液惡性病方面已取得顯著成功。然而，在受此治療影響之癌症中，通常小於約15%之患者可長期自用檢查點抑制劑進行之治療受益(Haslam及Prasad, 2019)，且已證實檢查點抑制劑在某些癌症中不太有效，包括乳房及前列腺癌。免疫抑制機制，尤其由調節性T細胞(Treg)介導之免疫抑制機制之持久性可促進所觀測到的某些癌症或某些患者對用檢查點抑制劑進

行之治療之抗性(Fares等人, 2019；Han等人, 2019)。作為一種用於克服此抗性之手段，本申請案揭示用於藉由降低Treg之免疫抑制作用來刺激免疫系統之方法。

【0004】 腫瘤浸潤性$CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^+$ Treg，$CD4^+$ T細胞之子集，為免疫性自體耐受性之介體。與Treg發育及功能相關之基因之不足可在小鼠(Fontenot等人, 2003；Khattri等人, 2003；Tivol等人, 1995)及人類(Yagi等人, 2004；Kuehn等人, 2014)中引起系統性自體免疫，揭示Treg在保持免疫穩態中之重要的非冗餘性作用。Treg經由多種機制來抑制免疫系統，包括下調效應T細胞之誘導及增殖、趨化介素及抑制性細胞介素之分泌，以及樹突狀細胞成熟及功能之抑制(Shitara及Nishikawa, 2018；Han等人, 2019)。可在腫瘤微環境中引入由Treg用於促進自體耐受性之機制，以抑制抗腫瘤免疫反應。實際上，小鼠中之Treg之全身性消耗足以實現免疫介導之腫瘤消退(Teng等人, 2010)。因此，認為Treg在介導對自體抗原之周邊耐受性、預防自體免疫疾病及抑制抗腫瘤免疫反應中起作用。

【0005】 因此，已確定降低腫瘤浸潤性Treg之活性或數目為有吸引力的逆轉腫瘤微環境中之免疫抑制活性及增強抗腫瘤免疫性之方法(Finotello及Trajanoski, 2017；Han等人, 2019)。在癌症免疫療法中已經且正在實行各種方法以靶向Treg，包括使用針對表現於Treg上之抗原(諸如CD25 (Arce Vargas等人, 2017)、CCR4 (Ishida等人, 2012；Hagemann等人, 2014)及CTLA-4 (Korman等人, 2017))之抗體(Ab)進行的ADCC介導之Treg消耗，及抑制E3泛蛋白連接酶Siah2 (Scortegagna等人, 2020)及Yes相關蛋白質(YAP；Ni等人, 2018)。然而，特異性靶向或消耗來自腫瘤微環境之Treg之臨床嘗試並不成功。與IL-2融合之白喉毒素(Diphtheria

toxin)(地尼介白素迪夫托斯(denileukin diftitox))未能有效地降低黑素瘤患者中之Treg數目(Luke等人, (2016))，且儘管在小鼠腫瘤模型中顯示抗CTLA-4介導之Treg消耗(Selby等人, 2013；Simpson等人, 2013)，但尚不清楚在人類癌症中由伊派利單抗或曲美木單抗(tremelimumab)(抗人類CTLA-4 Ab)引起之Treg消耗之明確證據(Sharma等人, 2019a；Sharma等人, 2019b)。藉由未經岩藻醣基化(nf)之抗CCR4 Ab莫格利珠單抗(mogamulizumab)實現Treg消耗，但亦觀測到習知$CD4^+$ T細胞之顯著消耗及$CD8^+$ T細胞數目之中度降低(Kurose等人, 2015)，從而限制其在治療實體腫瘤方面之效用。因此，仍需要安全且有效的Treg消耗劑，其亦避開T效應細胞(Teff)以實現最佳抗腫瘤反應。

【0006】 CCR8為一種趨化介素受體，其最近被鑑別為腫瘤浸潤性Treg之潛在特異性標記物，因為在多種癌症(包括乳房、大腸直腸及肺)中，此等Treg中之CCR8表現選擇性地上調(Plitas等人, 2016；De Simone等人, 2016；Wang等人, 2019)，且作為IRF4依賴性『效應子』Treg基因計劃之核心成員(Alvisi等人, 2020)。此等$CCR8^+$ Treg表示Treg之高度活化及抑制性亞群，且此等腫瘤類型中之$CCR8^+$ Treg之高豐度與不良預後相關聯(Wang等人, 2019；De Simone等人, 2016)。因此，CCR8可為有前景的用於實現腫瘤駐留Treg之消耗以提高抗腫瘤免疫性之治療目標。靶向CCR8，同時消耗抑制性Treg，亦可具有不消耗驅動抗腫瘤免疫反應之細胞溶解效應細胞之優點。此外，因為CCR8極少在周邊血液或其他組織中之Treg及Teff上表現，因此靶向$CCR8^+$腫瘤Treg可產生最小的毒性風險。

【0007】 CCR8為主要表現於瘤內$FOXP3^{hi}$ Treg上之七跨膜G蛋白質偶合趨化介素受體(GPCR)(Wang等人, 2019；Plitas等人, 2016；De

Simone等人, 2016)。CCR8之N端及ECL2區域對於結合於其功能性配位體C-C模體趨化介素配位體1 (CCL1)而言係重要的，該配位體係由瘤內骨髓細胞及T細胞產生。除影響Treg遷移至腫瘤微環境(TME)以外，CCL1:CCR8相互作用亦經由CCR8、FOXP3、IL-10及其他抑制因子之上調而增強Treg之免疫抑制能力(Vila-Caballer等人, 2019)。

【0008】 最近頒佈之美國專利案第10,087,259號主張一種用於治療癌症之方法，其係藉由向癌症患者投與Ab藥劑，該藥劑特異性結合於CCR8，使得以比正常組織浸潤性T細胞更大的程度來特異性消耗患者中之腫瘤浸潤性Treg細胞。然而，此專利案未舉例說明任何特異性結合於CCR8之Ab藥劑，其亦未說明任何藉由向個體投與抗CCR8 Ab來治療任何癌症之方法。

【0009】 美國專利案第10,550,191號主張一種用於治療癌症之方法，其包含投與針對CCR8之Ab。實例說明單一Ab，可商購的大鼠IgG2b抗小鼠CCR8 (抗mCCR8)Ab (純系SA214G2；BioLegend, San Diego, CA)，降低小鼠腫瘤模型中之各種腫瘤之體積。未揭示抗人類CCR8 (抗hCCR8)Ab或任何適用於人類療法之嵌合、人類化或人類Ab。

【0010】 PCT公開案第WO 2018/112033號係關於藉由向個體投與藥劑來治療癌症之方法，該藥劑誘導表現表1或2中所包括之指定基因產物之腫瘤浸潤性Treg細胞中之細胞毒性且藉此降低個體中之腫瘤浸潤性Treg細胞之數目或活性。CCR8並非表1或2中所包括之基因產物，但實例8表明抗mCCR8 Ab在小鼠MC38結腸腺癌模型中之中等水準之抗腫瘤活性。

【0011】 PCT公開案第WO 2019/157098號係關於包含重組李斯特菌株(recombinant Listeria strain)及抗CCR8 Ab之免疫原性組合物，及用

於治療個體中之腫瘤之方法，該方法包含向個體投與此免疫原性組合物。與美國專利案第10,550,191號類似，WO 2019/157098未報導產生任何抗CCR8 Ab，而是說明市售SA214G2抗mCCR8 Ab與基於李斯特菌(*Listeria*)之免疫療法之組合用於治療小鼠模型中之移植性結腸癌腫瘤之用途。

【0012】 最近，許多團隊報導用於消耗腫瘤相關Treg及治療癌症之人類化抗CCR8 Ab之產生(參見例如Depis等人, 2020；WO 2020/138489；Harbour BioMed, 2020)。

【0013】 本文中所揭示之本發明表明CCR8表現高度受限於來自不同腫瘤類型之腫瘤Treg。本發明包含抗CCR8 Ab，尤其抗CCR8 mAb，包括人類、人類化及嵌合抗hCCR8 mAb之產生，且證明小鼠腫瘤模型中之抗CCR8介導之Treg消耗需要Fc接合。本發明亦描述在離體人類腫瘤培養物系統中介導腫瘤特異性Treg消耗之nf抗hCCR8 Ab之研發。呈單藥療法或與檢查點阻斷(舉例而言，PD-1/PD-L1信號傳導路徑之抑制)之組合形式之抗CCR8 Ab治療誘導強效抗腫瘤反應且可向對抗PD-1單藥療法不起反應之患者提供臨床效益。抗CCR8介導之Treg消耗與檢查點阻斷之作用機制之組合提供增加腫瘤細胞之殺傷且藉此治療廣泛範圍之癌症之獨特機會。

【發明內容】

【0014】 本發明提供經分離之Ab，較佳mAb，其特異性結合於表現於細胞表面上之CCR8，諸如人類CCR8 (hCCR8)且呈現各種功能特性，包括治療性Ab所需之特性。此等特性包括以高親和力結合於CCR8表現細胞，諸如腫瘤浸潤性、經活化之$CD4^{+}FOXP3^{high}$ Treg；除Treg以外，僅結

合於胸腺之髓質及皮膚之真皮中之極少且分散的免疫細胞，但不結合於許多其他組織；介導藉由ADCC進行之CCR8表現細胞，諸如腫瘤浸潤性、經活化之$CD4^{+}FOXP3^{high}$ Treg之消耗；特異性介導腫瘤浸潤性Treg，但非正常組織中之$CCR8^{+}$ T細胞之消耗；抑制CCL1與CCR8之結合且抑制CCR8/CCL1信號傳導；在存在或不存在交聯Ab之情況下，當與細胞表面上之CCR8結合時，不引起CCR8之內化；活體外且在人類腫瘤離體組織樣品中介導$CCR8^{+}$ Treg之特異性消耗；及在以單藥療法或與另一種抗癌劑之組合形式向個體投與時，抑制個體，較佳人類個體中之腫瘤細胞之生長。在較佳實施例中，抗CCR8 Ab為包含經修飾之重鏈恆定區(諸如低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化(nf)之重鏈恆定區)之經修飾之mAb，其與未經修飾之mAb相比以較高親和力結合於Fcγ受體(FcγR)且介導增強之ADCC。

【0015】 特定言之，本發明提供經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其特異性結合於表現於細胞表面上之CCR8且介導藉由ADCC進行之CCR8表現細胞之消耗。在某些實施例中，CCR8為具有SEQ ID NO:1中所闡述之胺基酸序列之hCCR8。在某些其他實施例中，Ab，例如mAb，或其抗原結合部分包含具有人類IgG1或IgG3同型之重鏈恆定區。

【0016】 本發明亦提供包含經修飾之重鏈恆定區之經修飾之抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分，其與未經修飾之mAb或其抗原結合部分相比以較高親和力結合於Fcγ受體(FcγR)且介導增強之ADCC。在較佳實施例中，經修飾之mAb或其抗原結合部分包含經修飾之IgG1重鏈恆定區，其呈現降低之岩藻醣基化作用。在某些實施例中，mAb或其抗原結合部分結合於hCCR8之N端肽，其中抗原決定基包含具有序列

$Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$ (SEQ ID NO:2)之肽內之至少一個胺基酸且進一步包含硫酸化tyr-15及/或硫酸化tyr-17殘基。在某些較佳實施例中，mAb或其抗原結合部分結合於hCCR8之N端肽，其中抗原決定基包含具有序列$V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)之肽內之至少一個胺基酸且進一步包含硫酸化tyr-15及硫酸化tyr-17殘基。

【0017】 在某些實施例中，抗CCR8 mAb或其抗原結合部分呈現以下特性中之至少一種，例如至少2、3、4、5、6、7種或全部：(a)以約1 nM或更低之EC_{50}或約2 nM或更低之EC_{50}特異性結合於表現於細胞表面上之CCR8；(b)結合於胸腺之髓質及皮膚之真皮中之極少且分散的免疫細胞，但不結合於人類大腦、小腦、心臟、肝臟、肺、腎臟、扁桃體、脾、胸腺、結腸、胃、胰臟、腎上腺、垂體、皮膚、周邊神經、睪丸或子宮組織或周邊血液單核細胞(PBMC)；(c)以約5 nM或更低之IC_{50}抑制CCL1與CCR8之結合及抑制CCR8/CCL1信號傳導；(d)當結合於細胞表面上之CCR8時，以約10 pM或更低之EC_{50}或以約60 pM或更低之EC_{50}介導細胞消耗；(e)當投與個體時，介導腫瘤浸潤性Treg之消耗，但實質上避開脾、血液、皮膚或胸腺中之$CCR8^+$ T細胞；(f)在存在或不存在交聯Ab之情況下，當結合於細胞表面上之CCR8時，不引起CCR8之內化；(g)當以單藥療法形式投與個體時，抑制個體中之腫瘤細胞之生長；及(h)當與用於治療癌症之其他治療劑(諸如免疫檢查點抑制劑)組合投與個體時，抑制個體中之腫瘤細胞之生長。

【0018】 特定言之，在某些較佳實施例中，抗CCR8 mAb或其抗原結合部分至少呈現以下特性：(a)以約1 nM或更低之EC_{50}或約2 nM或更低之EC_{50}特異性結合於表現於細胞表面上之CCR8；(b)以約5 nM或更低之

IC_{50}抑制CCL1與CCR8之結合及抑制CCR8/CCL1信號傳導；(c)當結合於細胞表面上之CCR8時，以約10 pM或更低之EC_{50}或約60 pM或更低之EC_{50}介導細胞消耗；(d)當投與個體時，介導腫瘤浸潤性Treg之消耗，但實質上避開脾、血液、皮膚或胸腺中之$CCR8^+$ T細胞；(e)當以單藥療法形式投與個體時，抑制個體中之腫瘤細胞之生長；及(f)當與用於治療癌症之其他治療劑(諸如免疫檢查點抑制劑)組合投與個體時，抑制個體中之腫瘤細胞之生長。

【0019】 在其他實施例中，抗CCR8 mAb或其抗原結合部分至少呈現以下特性：(a)以約1 nM或更低之EC_{50}或約2 nM或更低之EC_{50}特異性結合於表現於細胞表面上之CCR8；(b)當結合於細胞表面上之CCR8時，以約10 pM或更低之EC_{50}或約60 pM或更低之EC_{50}介導細胞消耗；(c)當投與個體時，介導腫瘤浸潤性Treg之消耗，但實質上避開脾、血液、皮膚或胸腺中之$CCR8^+$ T細胞；及(d)當與用於治療癌症之其他治療劑(諸如免疫檢查點抑制劑)組合投與個體時，抑制個體中之腫瘤細胞之生長。

【0020】 已詳細檢驗本發明之某些Ab之此等特性，包括例如本文中稱為14S15及4A19之Ab。MAb 4A19為nf人類化Ab，而mAb 14S15為nf嵌合Ab，其包含移植至人類Fc區上之小鼠Fab片段，且用包括14S15及4A19之mAb進行本文中所描述之若干分析法。接著，藉由修飾構架序列以對應於最類似的人類生殖系序列來將14S15 mAb人類化，以產生稱為14S15h之Ab (參見實例10)。在重鏈可變域之親和力成熟之後產生的最後一代人類化mAb呈現與此AB之原始小鼠或嵌合版本類似且實際上略微更高的對hCCR8之結合親和力(14S15h Fab片段之K_D為0.64 nM對比起始小鼠mAb為1.4 nM)。因此，預期14S15h將呈現與關於嵌合14S15 mAb所證

明相同或極類似的功能特性。因此，上述功能特性(單獨或呈組合形式)可與mAb 14S15、14S15h及4A19之結構特徵組合存在。

【0021】 舉例而言，在本發明之某些實施例中，Ab或其抗原結合部分可包含以上特性中之一或多者(例如，以上特性中之至少2、3、4、5或6種)且包含以下中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域：包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸之V_H，及包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸之V_L。作為另一實例，此類Ab或其抗原結合部分可包含如由Kabat方法定義之以下CDR域：V_H CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:33所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_H CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:34所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_H CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:35所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_L CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:36所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_L CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:37所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及V_L CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:38所闡述之序列的連續連接之胺基酸。作為另一實例，此類Ab或其抗原結合部分可包含V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸。作為另一實例，此類Ab可包含重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:100所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:112所闡述之序列的連續連接之胺基酸。視情況地，Ab之重鏈具有降低之岩藻醣基化作用，或具有低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之重鏈恆定區，如本文中其他地方所描述。

【0022】 舉例而言，在本發明之某些其他實施例中，Ab或其抗原結

合部分可包含以上特性中之一或多者(例如，以上特性中之至少2、3、4、5或6種)且包含以下中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域：包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸之V_H，及包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸之V_L。作為另一實例，此類Ab或其抗原結合部分可包含如由Kabat方法定義之以下CDR域：V_H CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:103所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_H CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:104所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_H CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:105所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_L CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:106所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_L CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:107所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及V_L CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:108所闡述之序列的連續連接之胺基酸。作為另一實例，此類Ab或其抗原結合部分可包含V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸。作為另一實例，此類Ab可包含重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:117所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:118所闡述之序列的連續連接之胺基酸。視情況地，Ab之重鏈具有降低之岩藻醣基化作用，或具有低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之重鏈恆定區，如本文中其他地方所描述。

【0023】 舉例而言，在本發明之某些其他實施例中，Ab或其抗原結合部分可包含以上特性中之一或多者(例如，以上特性中之至少2、3、4、5或6種)且包含以下中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域：包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸之V_H，及包含具有如

SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸之V_L。作為另一實例，此類Ab或其抗原結合部分可包含如由Kabat方法定義之以下CDR域：V_H CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:45所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_H CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:46所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_H CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:47所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_L CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:48所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_L CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:49所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及V_L CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:50所闡述之序列的連續連接之胺基酸。作為另一實例，此類Ab或其抗原結合部分可包含V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸。作為另一實例，此類Ab可包含重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸。視情況地，Ab之重鏈具有降低之岩藻醣基化作用，或具有低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之重鏈恆定區，如本文中其他地方所描述。

【0024】 本發明亦提供經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8且包含以下重鏈及輕鏈可變區對中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:3所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:15所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基

酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(c) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:5所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:17所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(d) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(e) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:7所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:19所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(f) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:8所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:20所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(g) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:9所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:21所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(h) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:10所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:22所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(i) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:11所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:23所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(j) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:12所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:24所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(k) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:13所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:25所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(l) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:14所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:26所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(m) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0025】 特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8且包含以下重鏈及輕鏈可變區對中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域的經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分為特定實例：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及

(c) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基

酸。

【0026】 特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8且包含以下重鏈及輕鏈可變區對中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域的經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分為特定實例：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0027】 CDR之序列可由各種方法定義，包括Kabat、Chothia、AbM、接觸式(contact)及IMGT定義。除非另有明確說明，否則在本發明中藉由Kabat定義來鑑別CDR。

【0028】 本發明亦提供編碼本文中所描述之抗CCR8 mAb中之任一者或其抗原結合部分之經分離之核酸。本發明提供包含該經分離之核酸之表現載體，及包含該表現載體之宿主細胞。此宿主細胞可用於製備抗CCR8 mAb或其抗原結合部分之方法中，該方法包含在該宿主細胞中表現mAb或其抗原結合部分及自宿主細胞分離mAb或其抗原結合部分。

【0029】 在某些實施例中，本發明提供一種用於治療罹患癌症之個體之方法，其包含向個體投與例如介導CCR8表現細胞之消耗的治療有效量之本文中所描述之抗CCR8 mAb或其抗原結合部分，使得個體得到治療。在其他實施例中，本發明提供一種用於抑制個體中之腫瘤細胞之生長之方法，其包含向個體投與例如介導CCR8表現細胞之消耗的治療有效量之本文中所描述之抗CCR8 mAb或抗原結合部分，使得抑制個體中之腫瘤細胞之生長。在此等方法之某些實施例中，當結合於細胞表面上之CCR8時，抗CCR8 mAb以約10 pM或更低之EC_{50}介導細胞之消耗。在某些其他

實施例中，當結合於細胞表面上之CCR8時，抗CCR8 mAb以約5 nM或更低之IC_{50}抑制CCL1與CCR8之結合且抑制CCR8/CCL1信號傳導。在其他實施例中，本發明提供例如介導CCR8表現細胞之消耗的本文中所描述之抗CCR8 mAb或其抗原結合部分，其係用於治療罹患癌症之個體之方法中或用於抑制個體中之腫瘤細胞之生長之方法中，各方法包含向個體投與治療有效量之抗CCR8 mAb或其抗原結合部分。

【0030】 本發明亦提供用於治療罹患癌症之個體之方法，其包含向個體投與治療有效量之以下之組合：(a)抗CCR8 Ab，例如本文中所描述之mAb或其抗原結合部分，其例如介導CCR8表現細胞之消耗，及(b)其他用於治療癌症之治療劑，視情況其中該其他治療劑為降低免疫系統之抑制或增加免疫系統之刺激之化合物。在某些較佳實施例中，該其他治療劑為拮抗性Ab或其抗原結合部分，其特異性結合於PD-1、PD-L1或CTLA-4。該方法亦可為用於抑制個體中之腫瘤細胞之生長之方法。

【0031】 當此類方法涉及使用治療劑之組合時，其可以不同方式提及。舉例而言，當治療方法使用藥劑(A)及(B)時，例如用於治療癌症，此可稱為：(i)用於治療癌症之方法之藥劑(A)及藥劑(B)；(ii)在用於治療癌症之方法中與藥劑(B)一起使用之藥劑(A)；或(iii)在用於治療癌症之方法中與藥劑(A)一起使用之藥劑(B)。因此，以上組合可稱為：

(i) (A)抗CCR8 mAb或其抗原結合部分，例如，其介導CCR8表現細胞之消耗，及(B)其他用於治療癌症之治療劑，用於治療罹患癌症之個體之方法中或用於抑制個體中之腫瘤細胞之生長之方法中，該方法包含向個體投與治療有效量之以下之組合：(A)抗CCR8 mAb或其抗原結合部分，例如其介導CCR8表現細胞之消耗，及(B)其他用於治療癌症之治療劑；或

(ii) (A)抗CCR8 mAb或其抗原結合部分，例如，其介導CCR8表現細胞之消耗，與(B)其他治療劑一起用於治療癌症，用於治療罹患癌症之個體之方法中或用於抑制個體中之腫瘤細胞之生長之方法中，該方法包含向個體投與治療有效量之以下之組合：(A)抗CCR8 mAb或其抗原結合部分，例如其介導CCR8表現細胞之消耗，及(B)其他用於治療癌症之治療劑；或

(iii) (B)其他用於治療癌症之治療劑，其與(A)例如介導CCR8表現細胞之消耗的抗CCR8 mAb或其抗原結合部分一起使用，用於治療罹患癌症之個體之方法中或用於抑制個體中之腫瘤細胞之生長之方法中，該方法包含向個體投與治療有效量之以下之組合：(B)其他用於治療癌症之治療劑，及(A)例如介導CCR8表現細胞之消耗的抗CCR8 mAb或其抗原結合部分。

【0032】 本發明亦提供一種套組，其包含：(a)在約0.01至約20毫克/公斤體重之範圍的一或多種劑量或約0.1至約2,000 mg固定劑量之經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其特異性結合於表現於細胞表面上之CCR8且介導藉由ADCC進行之CCR8表現細胞之消耗；(b)視情況地，在約200至約1600 mg之範圍內的一或多種劑量之mAb或其抗原結合部分，其特異性結合於PD-1、PD-L1或CTLA-4；及(c)在本文中所揭示之治療方法中使用特異性結合於CCR8之經分離之Ab或其部分及視情況地，特異性結合於PD-1、PD-L1或CTLA-4之mAb或其部分之說明。

【0033】 本發明之其他特徵及優點將自以下詳細說明及實例顯而易見，該等詳細說明及實例不應視為限制性的。所引用之所有參考文獻(包括在本申請案通篇中所引用之科學文章、GenBank項、專利案及專利申請

案)的內容皆明確地以引用之方式併入本文中。

【圖式簡單說明】

【0034】

圖1A-1C展示癌症基因體圖譜(Cancer Genome Atlas；TCGA)中之人類*CCR8*及*FOXP3*基因-基因相關性之分析。A：跨越所有非血基質TCGA腫瘤RNA-seq之基因-基因相關性之基於相互等級之網狀圖將CCR8鑑別為Treg選擇性標記物。B：肝細胞癌瘤(HCC)單個細胞RNA-seq之分析表明CCR8選擇性表現於HCC腫瘤樣品中之FOXP3^{high}淋巴細胞上。C：在FOXP3^{+} T淋巴細胞中進行之斯皮爾曼相關性分析(Spearman correlation analysis)表明CCR8表現與較高的FOXP3表現量相關聯。

圖2A-2F展示與其他Treg靶向分子相比，CCR8表現在腫瘤Treg上富集。A：來自癌症患者(大腸直腸、腎臟、肺及黑素瘤)之腫瘤及血液之Treg中的CCR8、CCR4、CTLA-4及CD25陽性率之流式細胞測量術分析(n=8-18)。B：來自癌症患者之血液(n=6-10)及腫瘤(n=7-20)之CD4^{+}FOXP3^{+} Treg上的Treg目標之相對表現量(MFI)。C-E：來自腫瘤(C)及血液(D)之CD4^{+} Tconv以及來自癌症患者之腫瘤(E)(n=7-17)及周邊血液樣品(F)(n=5-13)之CD8^{+} T細胞上之Treg目標出現率。未分析所有患者之所有標記物且並非所有患者皆具有相匹配的血液樣品。*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，****P<0.0001。A-B：雙因子ANOVA，接著進行龐費洛尼多重比較測試(Bonferroni's multiple comparisons test)；C-F：單因子ANOVA克拉斯卡-瓦立斯測試(Oneway ANOVA Kruskal-Wallis test)，接著進行鄧恩多重比較(Dunn's multiple comparisons)。

圖3A-3C展示流式細胞測量術分析，其說明CCR8大量表現於腫瘤浸

潤性Treg上。在不同T細胞群體中量測CCR8之表現量。A：表現CCR8之腫瘤浸潤性T淋巴細胞子集之百分比。與習知$CD4^+FOXP3^-$ (CD4 Tconv)T細胞及$CD8^+$ T細胞(CD8)相比，腫瘤浸潤性Treg以顯著更高的頻率表現CCR8。B：結合於腫瘤浸潤性T淋巴細胞子集之PE結合之抗CCR8 Ab之平均螢光強度(MFI)。與CD4 Tconv及CD8細胞相比，以每個細胞計，腫瘤Treg亦表現更大量的CCR8。C：癌症患者之血液及腫瘤組織中之$CCR8^+$ Treg上的Treg CCR8表現量之比較。與腫瘤浸潤性Treg上之顯著更高的量相比，周邊血液中之Treg上的CCR8表現量較低。

圖4A-4D展示CCR8在不同Treg亞群上差異性表現。A：來自健康個體之PBMC中的不同T細胞群體內之表現CCR8之細胞之百分比。CCR8大量表現於周邊Treg上。B：健康個體中之不同Treg亞群內的表現CCR8之細胞之百分比。在Treg群體內，CCR8在效應子記憶群體(EM)中較大量地表現且在中心記憶細胞(CM)中以較低程度表現，且極少量的CCR8在原生Treg中表現。C：習知CD4 Tconv細胞內的表現CCR8之細胞之百分比。此等CD4 Tconv細胞之任何亞群中存在極少的CCR8表現。D：結合於來自周邊血液之$CCR8^+$ Treg或來自癌症患者之腫瘤浸潤性Treg之抗CCR8 Ab之平均螢光強度(MFI)。在癌症患者中，以每個細胞計，與來自周邊血液之Treg相比，腫瘤浸潤性Treg上存在更高的CCR8表現。

圖5展示CCR8表現於免疫抑制性最高的$CD4^+FOXP3^{high}$ Treg群體上。將來自2名黑素瘤患者及1名腎細胞癌(RCC)患者之腫瘤針對FOXP3及CCR8表現進行解離及染色。CCR8主要由代表活化程度最高之Treg之$CD4^+FOXP3^{high}$群體表現。

圖6A-6D展示表現CD25、CD39及IL1R2之$CCR8^+$及$CCR8^-$ T細胞之

百分比。A：表現CD25之$CCR8^+$及$CCR8^-$細胞之百分比；B：表現CD39之$CCR8^+$及$CCR8^-$細胞之百分比；C：表現IL1R2之$CCR8^+$及$CCR8^-$細胞之百分比；D：表現IL1R2之經刺激之$CCR8^+$及$CCR8^-$細胞之百分比。

圖7A-7D展示表現CD25、CD39及IL1R2之$CCR4^+$及$CCR4^-$ T細胞之百分比。A：表現CD25之$CCR4^+$及$CCR4^-$細胞之百分比；B：表現CD39之$CCR4^+$及$CCR4^-$細胞之百分比；C：表現IL1R2之$CCR4^+$及$CCR4^-$細胞之百分比；D：表現IL1R2之$CCR4^+$及$CCR4^-$細胞之百分比。

圖8A及8B展示表現活化標記物HLA-DR之$CCR8^+$及$CCR8^-$ T細胞之百分比(8A)，及表現此標記物之$CCR4^+$及$CCR4^-$ T細胞之百分比(8B)。

圖9A-9C展示表現IFNγ、IL-2及顆粒酶B之經刺激之$CCR8^+$及$CCR8^-$ T細胞之百分比。A：表現IFNγ之經刺激之$CCR8^+$及$CCR8^-$細胞之百分比；B：表現IL-2之經刺激之$CCR8^+$及$CCR8^-$細胞之百分比；C：表現顆粒酶B之經刺激之$CCR8^+$及$CCR8^-$細胞之百分比。

圖10A-10C展示表現IFNγ、IL-2及顆粒酶B之經刺激之$CCR4^+$及$CCR4^-$ T細胞之百分比。A：表現IFNγ之經刺激之$CCR4^+$及$CCR4^-$細胞之百分比；B：表現IL-2之經刺激之$CCR4^+$及$CCR4^-$細胞之百分比；C：表現顆粒酶B之經刺激之$CCR4^+$及$CCR4^-$細胞之百分比。

圖11A及11B展示不同的抗hCCR8 mAb與表現hCCR8之細胞株或經活化之人類Treg之結合。A：產生抗hCCR8 Ab，其呈現不同範圍之對經hCCR8轉染之細胞株(293F、CHO、Raji)及經活化之人類Treg之結合親和力(EC_{50}組，以nM表示)。B：展示結合於經活化之Treg的抗CCR8 mAb之所選擇的子集之EC_{50}值(nM)。

圖12A及12B展示結合於hCCR8 N端肽之4A19 Fab片段之晶體結構。

A：以2.03 Å解析度結合於僅經硫酸化(在tyr-17處)之hCCR8 N端肽之4A19 Fab片段。由4A19 mAb結合之抗原決定基包含殘基15-21，其中硫酸化酪胺酸-17殘基位於抗原決定基之中心；B：以1.80 Å解析度結合於經雙硫酸化(在tyr-15及tyr 17處)之hCCR8 N端肽之4A19 Fab片段。由4A19 mAb結合之抗原決定基包含殘基12-22。

圖13A及13B展示分別以1 μg/ml (上部小圖)及3 μg/ml (上部小圖)施用於正常人類PBMC及正常人類胸腺的不同抗hCCR8 mAb之組織交叉反應性。A：mAb 18Y12 (左側小圖)、16B13 (中間小圖)及4A19 (右側小圖)與PBMC之結合。mAb 18Y12及4A19未結合於PBMC，而16B13展示與目標之大量結合，該目標不太可能為CCR8。B：mAb 18Y12 (左側小圖)、16B13 (中間小圖)及4A19 (右側小圖)與胸腺組織之結合。mAb 18Y12未展示任何染色，而在胸腺之髓質中的稀少及分散的免疫細胞中觀測到mAb 4A19之陽性染色。mAb 16B13展示胸腺中之絕大部分免疫細胞中之強烈及彌漫性染色，其中主要為細胞質及/或核周模式。

圖14A-14C展示抗hCCR8 mAb阻斷人類CCL1 (hCCL1)與hCCR8之結合。A：抗hCCR8 mAb呈現不同的阻斷經hCCR8轉染之CHO細胞上hCCL1與hCCR8之結合之能力，如藉由Ca通量之抑制所評估。B：展示7種所選擇的抗hCCR8 Ab之CCL1信號傳導(CCL1誘導之Ca通量)之阻斷百分比。C：展示4種所選擇的抗CCR8 mAb之Ca通量阻斷IC_{50}曲線。

圖15A及15B展示抗hCCR8 mAb介導CD16表現報導細胞之CD16交聯，其反映抗CCR8 mAb之ADCC潛力。用抗CCR8 Ab (具有未經岩藻醣基化(nf)或野生型hIgG1主鏈)處理表現CD16之螢光素酶報導細胞與表現CCR8之Raji細胞或經活化之Treg之共同培養物。A：觀測到某一範圍內

之CD16交聯能力。B：描繪所選擇的具有hIgG1-nf主鏈之抗hCCR8 mAb之集合的使用經活化之Treg作為目標之CD16交聯。

圖16展示抗CCR8 Ab藉由同種異體NK細胞來介導經活化之Treg之殺傷。將經活化之Treg與經預致敏之同種異體NK細胞及經滴定之抗hCCR8 Ab共同培養。藉由Treg上之磷脂結合蛋白-V陽性來量測細胞死亡。

圖17A及17B展示抗CCR8 mAb活體外藉由同種異體NK細胞介導患者腫瘤Treg之殺傷。將以酶促方式解離之患者子宮內膜腫瘤與經預致敏之同種異體NK細胞一起在37℃下共同培養24小時。抗CCR8 Ab，14S15，特異性消耗患者腫瘤Treg (圖17A)，但不消耗習知$CD4^+$ T細胞(圖17B)。相比之下，抗CCR4 Ab (CCR4)介導Treg及習知$CD4^+$ T細胞之消耗(圖17A及17B)。

圖18A-18I展示抗hCCR8-hIgG1-nf Ab在不添加同種異體NK細胞之情況下介導離體患者腫瘤切片培養物系統中之$CCR8^+$ Treg消耗。A-C：在活體外用14S15-IgG1-nf或抗hCCR4-IgG1-nf處理後，周邊血液Treg (A)、$CD4^+$ Tconv (B)及$CD8^+$ T細胞(C)之消耗之代表性結果。D-F：來自比較14S15-IgG1-nf (D)、抗hCCR4-IgG1-nf (E)及同型(F)Ab之非小細胞肺癌(NSCLC)腫瘤及同種異體NK細胞殺傷分析法之代表性曲線。A-F：14S15-IgG1-nf，實心圓；抗hCCR4-IgG1-nf，正方形；同型IgG1-nf，空心圓。G：比較16B13-IgG1-nf與抗hCCR8-惰性及同型對照Ab之同種異體NK及NSCLC腫瘤共同培養。G：同型IgG1-nf，空心圓；14S15-IgG1-nf，實心圓；14S15-IgG1-惰性，三角形。H及I：來自在存在16B13-IgG1-nf或IgG1-nf同型對照之情況下培養24小時的腎細胞癌(H)及胃癌(I)之離體原發性完整腫瘤切片之結果(對於每種條件，3-5個技術複本)。H及

I：同型IgG1-nf，空心圓；14S15-IgG1-nf，實心圓。*P<0.05，****P<0.0001。普通單因子ANOVA及杜凱氏多重比較測試(Tukey's multiple comparisons test)(G)。曼-惠特尼檢定(Mann-Whitney test)(雙尾)(G-I)。

圖19展示抗CCR8 Ab在存在或不存在交聯之情況下不誘導經活化之Treg上之CCR8內化。在存在或不存在抗人類Fc交聯Ab之情況下，將經活化之Treg與抗CCR8 mAb 4A19、陽性對照Ab (抗ICOS)及同型對照一起培育。在各種時間評估Treg表面上之CCR8表現。

圖20A-20D展示當經消化之患者腫瘤與同種異體自然殺手(NK)細胞活體外共同培養時，由抗CCR8引起之腫瘤Treg之消耗。A：mAb 4A19 (CCR8-nf)誘導可量測之患者腫瘤Treg之消耗，大於由未經岩藻醣基化之抗hCCR4 mAb (CCR4-nf)引起之消耗。B：相反，抗CCR4-nf Ab，但非mAb 4A19，誘導$CD4^+$ Teff細胞之消耗。C：抗CCR8及抗CCR4皆不消耗$CD8^+$ Teff。D：與4A19 (CCR8-nf)形成對比，具有無關的靶向臂之對照性抗匙孔螺血氰蛋白(KLH)-nf mAb(同型)及具有惰性主鏈之4A19 mAb (CCR8-惰性)皆不消耗Treg。

圖21A-21D展示小鼠模型中之CT26結腸癌之抗CCR8抑制生長。A：用抗CCR8-mIgG2a (具有來源於BioLegend之大鼠抗mCCR8 mAb (純系SA214G2)之mIgG2a同型之抗mCCR8 Ab)治療CT26結腸癌可顯著減少腫瘤生長及增加無腫瘤小鼠之數目。描繪個別腫瘤體積。B：平均腫瘤體積之變化。C：在抗CCR8治療情況下觀測到腫瘤Treg消耗，而脾Treg之數目不受抗CCR8治療影響(D)。

圖22A-22F展示在患有CT26結腸腺癌之小鼠中，抗CCR8對T淋巴細

胞群體之作用，如藉由流式細胞測量術分析。A：脾、血液、腫瘤Treg及皮膚中之表現$CD4^+FOXP3^+$ Treg之CCR8 (Treg)、FOXP3-$CD4^+$效應細胞(CD4eff)及$CD8^+$ T (CD8T)細胞之百分比。B：表現雙重陰性$CD4^-CD8^-$之CCR8 (DN)、單陽性$CD4^+CD8^-$ (CD4 SP)、單陽性$CD4^-CD8^+$ (CD8 SP)及雙重陽性$CD4^+CD8^+$ (DP)胸腺細胞之百分比。C：在用抗CCR8-mIgG2a mAb及同型對照物治療後，脾、血液、腫瘤及皮膚中之$Foxp3^+$ Treg之百分比。D：在用抗CCR8-mIgG2a及同型對照物治療後，胸腺中之DP、CD8 SP、CD4 SP及DN胸腺細胞之百分比。E：在用抗CCR8-mIgG2a及同型對照物治療後，皮膚中之$CD4^+$ T細胞之百分比。F：在用抗CCR8-mIgG2a及同型對照物治療後，皮膚中之$CD8^+$ T細胞之百分比。

圖23A及23B展示抗CCR8抑制小鼠模型中之MC38結腸癌。A：用抗CCR8-mIgG2a治療MC38結腸癌可顯著減少腫瘤生長及增加無腫瘤小鼠之數目。B：平均腫瘤體積之變化。

圖24A-24D展示抗mCCR8 Ab誘導之Treg消耗在MC38結腸癌小鼠模型中引起強效單一藥劑功效以及增加之藥效學及藥物動力學反應。A：抗mCCR8 mAb之單次劑量引起腫瘤體積之劑量依賴性降低、Treg ($Foxp3^+CD4^+$百分比)消耗(B)及腫瘤浸潤性$CD8^+$ T細胞之百分比增加(C)。誤差條指示平均值之標準差。D：抗mCCR8 mAb在0.03至3 mg/kg之劑量範圍內顯示非線性PK。

圖25A-25C展示與單獨的抗PD-1或抗CCR8 Ab療法相比，小鼠抗mPD-1 Ab與小鼠抗mCCR8 Ab之組合對腫瘤生長之作用，如藉由MB49鼠類膀胱癌模型中之腫瘤體積之變化所量測。A：抗CCR8-mIgG2a及抗PD-1分別誘導中等及低水準之腫瘤生長抑制，但在組合時顯示完全抑制腫瘤

生長之協同功效。B：在存在或不存在抗PD-1之情況下，用抗CCR8-mIgG2a進行治療可顯著降低腫瘤Treg出現率，但增加抗腫瘤$CD8^+$ T細胞出現率(C)。

圖26展示與單獨的抗PD-1或抗CCR8 Ab療法相比，小鼠抗mPD-1 Ab與小鼠抗mCCR8 Ab之組合對腫瘤生長之作用，如藉由4T1鼠類乳癌模型中之腫瘤體積之變化所量測。抗PD-1未展示抑制腫瘤生長方面之活性，其中腫瘤生長與用陰性對照Ab之組合治療之小鼠極類似，而抗CCR8-mIgG2a誘導中等水準之腫瘤生長抑制。抗CCR8與抗PD-1以協同方式相互作用，從而幾乎完全抑制腫瘤生長。

圖27A及27B展示包含惰性Fc恆定區之抗mCCR8 Ab在SA1N纖維肉瘤小鼠模型中呈現抗腫瘤活性。A：抗CCR8-mIgG2a治療有效地減少腫瘤生長，其中全部9隻小鼠在植入後第25天皆不具有腫瘤。用Fc-惰性Ab(抗CCR8-mIgG1-D265A)阻斷CCR8可部分減少腫瘤生長。B：由抗CCR8-mIgG2a治療而非Fc-惰性抗CCR8-mIgG1-D265A實現藉由用抗CCR8進行之治療來消耗腫瘤Treg。

圖28A-28F展示在MC38腫瘤模型中，抗mCCR8 Ab活性需要Fc受體接合。在200微克/小鼠/治療之情況下，在腫瘤植入後第7、10及14天，用抗CCR8-mIgG2a (n=10)(B)、抗CCR8-mIgG1-D265A (n=10)(C)或IgG2a同型對照物(n=10)(D)治療之C57BL/6小鼠中植入的MC38腫瘤之平均值(A)及個別生長曲線。E：在植入後第15天收集MC38腫瘤且藉由流式細胞測量術(n=5隻/組)來評估Treg消耗，**P<0.01。單因子ANOVA克拉斯卡-瓦立斯測試及鄧恩多重比較。F：在MC38腫瘤植入後第13天，MC38腫瘤及周邊組織中之$Ccr8^{+/+}$及$Ccr8^{-/-}$供體衍生之Treg之比例。**P<0.01。雙因

子ANOVA，接著進行龐費洛尼多重比較測試。

圖29A-29I展示抗CCR8-mIgG2a在異源再攻擊模型中誘導生產性記憶反應。在腫瘤達到100-120 mm^3後，將植入CT26腫瘤之小鼠隨機分組。A-C：在0.2毫克/小鼠/治療之情況下，在隨機分組之後第1、4及8天，用以下處理之CT26腫瘤中之生長曲線及Treg消耗：(A)抗CCR8-mIgG2a (n=8)，(B)抗CTLA4-mIgG2a (n=8)或(C)mIgG2a同型對照物(n=8)。在隨機分組之後第9天，藉由流式細胞測量術來分析來自各組之六個腫瘤，以評估Treg消耗(D)及AH1-四聚物$^+$ $CD8^+$ T細胞之出現率(E)。F：在治療之後第92天，血液中之AH1-四聚物$^+$ $CD8^+$ T細胞之出現率。G：在用LM-AH1A5攻擊之後第5天，血液中之AH1-四聚物$^+$ $CD8^+$效應子記憶T細胞(TEM)之出現率。H及I：在用AH1A5肽刺激5小時之後，脾中之(H)IFNγ^+及(I)多功能IFNγ^+TNFα^+ $CD8^+$ T細胞之細胞內細胞介素染色。ns，不顯著；*P<0.05，**P<0.01。單因子ANOVA克拉斯卡-瓦立斯測試及鄧恩多重比較(D-I)。

圖30A及30B展示多種人類癌症中之CCR8之可變表現。在來自兩個樣品集合(全尺寸組織切片及MTB集合)之17種癌症類型/亞型中進行免疫組織化學(IHC)。A：展示6種腫瘤類型/亞型之福爾馬林固定石蠟包埋(formalin-fixed paraffin-embedded；FFPE)載玻片中的$CCR8^+$細胞之完全載玻片影像分析之全尺寸組織切片，其中每種腫瘤類型具有14-24個樣品。B：展示16種腫瘤類型/亞型之多腫瘤塊體(MTB)集合，其中每種腫瘤類型具有20個病例。以每個FFPE塊體計，各MTB含有單一適應症之5個病例及作為陽性對照之1個增生性扁桃體樣品。

【實施方式】

【0035】 在整個本申請案中，各種公開案以括號提及作者名稱及日期，或提及專利案號或專利公開案號。可在說明書之結尾處，在申請專利範圍之前發現此等公開案之完全引用。此等公開案之揭示內容在此以全文引用的方式併入本申請案中，以更全面地描述截至本文中所描述及主張之本發明為止，如熟習此項技術者已知之目前先進技術。然而，僅在由參考文獻併入之資訊與由本申請案中之明確揭示內容提供之資訊之間不存在衝突的情況下將此等揭示案併入本申請案中。此外，本文中之參考文獻之引用不應視為承認此類參考文獻為本發明之先前技術。

【0036】

相關申請案之交叉參考

本申請案主張以下美國臨時申請案之權利：2021年3月5日提交之第63/157,618號；2020年6月2日提交之第63/041,992號；及2020年3月23日提交之第62/993,570號，其各自之內容在此以全文引用之方式併入本文中。

【0037】 本發明係關於特異性且以高親和力結合於表現於細胞表面上之CCR8之mAb，及用於治療個體中之癌症之方法，該方法包含以單藥療法或與諸如免疫檢查點抑制劑之抗癌劑、化學治療劑及/或放射療法組合之形式向個體投與抗CCR8 Ab。本文中在多種不同的臨床前小鼠腫瘤模型中證明單獨的CCR8介導之Treg消耗及其與PD-1阻斷之組合在有效抑制腫瘤生長方面之作用。

【0038】

術語

為了使本發明可更易於理解，首先對某些術語進行定義。如本申請案中所使用，除非本文中另外明確提供，否則以下術語中之每一者應具有下文闡述之含義。在整個本申請案中，闡述其他定義。

【0039】「投與(Administering/administer)」或「投藥」係指使用熟習此項技術者已知之多種方法及遞送系統中之任一者向個體物理引入包含治療劑之組合物。治療性Ab (諸如抗CCR8及抗PD-1 Ab)之較佳投藥途徑為靜脈內(IV)投藥。其他投藥途徑包括皮下(SC)、腹膜內(IP)、肌肉內(IM)、脊椎或其他腸胃外投藥途徑，例如藉由注射或輸注。如本文中所使用，片語「腸胃外投藥」意謂除經腸及局部投藥以外之投藥模式，通常藉由注射進行，且包括(但不限於)靜脈內、腹膜內、肌肉內、動脈內、鞘內、淋巴管內、病灶內、囊內、眶內、心內、皮內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛膜下、脊椎內、硬膜外及胸骨內注射及輸注，以及活體內電致孔。或者，本發明之Ab可經由非腸胃外途徑投與，諸如局部、表皮或黏膜投藥途徑，例如鼻內、經口、經陰道、經直腸、舌下或局部。投藥亦可例如進行一次、複數次及/或經一或多個延長之週期。

【0040】「抗體」(Ab)應包括(但不限於)特異性結合於抗原且包含由二硫鍵互連之至少兩個重(H)鏈及兩個輕(L)鏈的醣蛋白免疫球蛋白(Ig)或其抗原結合部分。各H鏈包含重鏈可變區(在本文中縮寫為V_H)及重鏈恆定區。IgG Ab之重鏈恆定區包含三個恆定域，即C_{H1}、C_{H2}及C_{H3}。各輕鏈包含輕鏈可變區(在本文中縮寫為V_L)及輕鏈恆定區。IgG Ab之輕鏈恆定區包含一個恆定域，即C_L。V_H及V_L區可進一步再分成高變區，稱為互補決定區(CDR)，穿插有稱為構架區(FR)的保守性更高之區域。各V_H及V_L包含三個CDR及四個FR，其自胺基端至羧基端按以下順序排列：FR1-

CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用之結合域。已使用各種方法劃定Ab內之CDR域，包括Kabat、Chothia、AbM、接觸式及IMGT定義。Ab之恆定區可介導Ig與宿主組織或因子，包括免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一組分(C1q)的結合。

【0041】 如本文中所使用且根據習知用法，描述為包含「一個」重鏈及/或「一個」輕鏈之Ab係指包含所述重鏈及/或輕鏈中之「至少一者」之Ab，且因此將涵蓋具有兩個或更多個重鏈及/或輕鏈之Ab。特定言之，如此描述之Ab將涵蓋具有兩個實質上一致重鏈及兩個實質上一致輕鏈之習知Ab。若Ab鏈由於轉譯後修飾(包括例如離胺酸殘基之C端裂解及替代性醣基化模式)而不同，則其可實質上一致但非完全一致。

【0042】 Ig可來源於任何通常已知的同型，包括(但不限於)IgA、分泌性IgA、IgG及IgM。IgG子類亦為熟習此項技術者所熟知且包括(但不限於)人類IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。「同型」係指由重鏈恆定區基因編碼之Ab類別或子類(例如，IgM、IgG1或IgG4)。作為實例，術語「抗體」包括天然存在及非天然存在之Ab、單株及多株Ab、嵌合及人類化Ab、人類或非人類Ab、完全合成Ab及單鏈Ab。非人類Ab可藉由重組方法來部分或完全人類化，以降低其在人類中之免疫原性。若未明確陳述且除非上下文指示，否則術語「抗體」亦包括前述Ig中之任一者之抗原結合片段或抗原結合部分，且包括單價及二價片段或部分，及單鏈Ab。

【0043】 「經分離之」Ab係指實質上不含其他具有不同抗原特異性之Ab的Ab (例如，特異性結合於CCR8之經分離之Ab實質上不含特異性結合於除CCR8以外之抗原之Ab，諸如結合於CCR4之Ab)。然而，特異性

結合於人類CCR8 (hCCR8)之經分離之Ab可與其他抗原(諸如來自不同物種(諸如小鼠及食蟹獼猴(cynomolgus monkey))之CCR8多肽)具有交叉反應性。此外，在某些情況下，經分離之Ab亦可意謂經純化以實質上不含其他細胞材料及/或化學物質之Ab。作為比較，「經分離之」核酸係指物質之核酸組合物，其與天然存在之核酸明顯不同，亦即，具有獨特的化學一致性、性質及效用。舉例而言，與原生DNA不同，經分離之DNA為原生DNA之獨立部分且不為在自然界中發現之較大的結構性複合物(染色體)之整體部分。此外，與原生DNA不同，經分離之DNA可用作PCR引子或雜交探針，以尤其用於量測基因表現及偵測生物標記物基因或突變，以用於診斷疾病或預測治療劑之功效。此外，在某些情況下，經分離之核酸可意謂使用此項技術中熟知的標準技術純化，以實質上不含其他細胞組分或其他污染物(例如，其他細胞核酸或蛋白質)之核酸。

【0044】 術語「單株」Ab (mAb)係指具有單一分子組成之Ab分子之非天然存在之製劑，亦即，一級序列實質上一致且對特定抗原決定基呈現單一結合特異性及親和力之Ab分子。mAb為經分離之Ab之實例。mAb可藉由融合瘤、重組、轉基因或熟習此項技術者已知之其他技術產生。

【0045】 「嵌合」Ab係指其中可變區來源於一個物種且恆定區來源於另一物種之Ab，諸如其中可變區來源於小鼠Ab且恆定區來源於人類Ab之Ab。

【0046】 「人類」mAb (HuMAb)係指具有可變區之mAb，其中構架及CDR區皆來源於人類生殖系免疫球蛋白序列。此外，若Ab含有恆定區，則恆定區亦來源於人類生殖系免疫球蛋白序列。本發明之人類Ab可包括不由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(例如，藉由活體

外隨機或定點突變誘發或藉由活體內體細胞突變引入之突變)。然而，如本文中所使用，術語「人類」Ab不意圖包括其中來源於另一種哺乳動物物種(諸如小鼠)的生殖系之CDR序列已移植至人類構架序列上之Ab。術語「人類」Ab及「完全人類」Ab係同義地使用。

【0047】「人類化」mAb係指其中非人類mAb之CDR域外的一些、大部分或所有胺基酸由來源於人類免疫球蛋白之相應胺基酸置換之mAb。在Ab之人類化形式之一個實施例中，CDR域外之一些、大部分或所有胺基酸已由來自人類免疫球蛋白之胺基酸置換，而一或多個CDR區內之一些、大部分或所有胺基酸未改變。容許胺基酸之小型添加、缺失、插入、取代或修飾，只要其不消除Ab結合於特定抗原之能力即可。「人類化」Ab保持與原始Ab類似之抗原特異性。

【0048】「抗抗原」Ab係指特異性結合於抗原之Ab。舉例而言，抗CCR8 Ab為特異性結合於CCR8之Ab，而抗PD-1 Ab為特異性結合於PD-1之Ab。如本文中所使用，「抗PD-1/抗PD-L1」Ab為用於破壞PD-1/PD-L1信號傳導路徑之Ab，其可為抗PD-1 Ab或抗PD-L1 Ab。

【0049】Ab之「抗原結合部分」或「抗原結合片段」係指Ab (例如，mAb)之一或多個片段，其保留特異性結合於由完整Ab結合之抗原之能力。

【0050】「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」(「ADCC」)係指活體外或活體內細胞介導之細胞毒性活性，其中在效應細胞表面上表現Fc受體(FcR)之非特異性效應細胞(例如，自然殺手(NK)細胞、巨噬細胞、嗜中性白血球及嗜酸性白血球)識別結合於目標細胞上之表面抗原的Ab之Fc區且有效地溶解目標細胞。原則上，可觸發任何具有活化性FcR之效應細胞

以介導ADCC。本發明之用於人類個體之治療性Ab較佳為抗hCCR8 Ab，其已經特定修飾以介導增強之針對表現CCR8之細胞之ADCC活性。Ab之ADCC活性可如例如實例17-20中之任一者中所描述來量測。

【0051】本發明之經修飾之Ab的「增強之ADCC」或「增強之ADCC活性」係指大於由未經修飾之Ab誘導之ADCC的ADCC活性水準。舉例而言，本發明之呈現增強之ADCC的經修飾之抗CCR8 IgG1 Ab為Ab之經修飾之形式，其與具有原生IgG1恆定域之Ab相比誘導更大的ADCC。未經岩藻醣基化(nf)之mAb為經修飾之Ab之實例，其經由改良之IgG與活化性FcγRIIIA之結合來誘導增強之ADCC。在某些實施例中，ADCC活性之增強程度為EC_{50}降低至少2倍，較佳至少10倍，更佳至少100倍，例如藉由NK細胞溶解分析法(例如，實例17中所描述之NK細胞溶解分析法)中之細胞溶解的EC_{50}之降低所量測。

【0052】「癌症」係指特徵在於身體中的異常細胞之不受控生長之廣泛各種疾病群。不受控的細胞分裂及生長分裂以及生長引起形成惡性腫瘤，其侵襲相鄰組織且亦可經由淋巴系統或血流轉移至身體之遠端部分。

【0053】「C-C模體趨化介素受體8」(「CCR8」；在此項技術中亦稱為例如CY6、TER1、CCR-8、CKRL1、CDw198、CMKBR8、GPRCY6、CMKBRL2或CC-CKR-8)為七跨膜GPCR；已證實此GPCR主要表現於瘤內$FOXP3^{hi}$ Treg上。如本文中所使用，術語「CCR8」包括人類CCR8 (hCCR8)、hCCR8之變異體、同功異型物、物種同源物，諸如小鼠CCR8 (mCCR8)，及與hCCR8具有至少一個共同抗原決定基之類似物。完整的hCCR8及mCCR8胺基酸序列可分別在GENBANK®寄存編號AAI07160.1及NP_031746.1中發現。

【0054】「細胞表面受體」係指表現於細胞表面上之分子或分子複合物，其能夠接收信號且跨越細胞之質膜發送信號。

【0055】「效應功能」係指Ab Fc區與FcR或配位體之相互作用，或由其引起之生物化學事件。例示性「效應功能」包括Clq結合、補體依賴性細胞毒性(CDC)、FcR結合、FcγR介導之效應功能，諸如ADCC及Ab依賴性細胞介導之吞噬作用(ADCP)，及細胞表面受體(例如，B細胞受體；BCR)之下調。此類效應功能通常需要Fc區與結合域(例如，抗體可變域)組合。

【0056】「Fc受體」或「FcR」為結合於免疫球蛋白之Fc區的受體。結合於IgG Ab之FcR包含FcγR家族之受體，包括此等受體之對偶基因變異體及交替剪接形式。FcγR家族由三種活化性受體(在小鼠中，FcγRI、FcγRIII及FcγRIV；在人類中，FcγRIA、FcγRIIA及FcγRIIIA)及一種抑制性受體(FcγRIIB)組成。人類FcγR之各種特性概述於表1中。大部分先天性效應細胞類型共同表現一或多種活化性FcγR及抑制性FcγRIIB，而NK細胞在小鼠及人類中選擇性地表現一種活化性Fc受體(在小鼠中，FcγRIII，且在人類中，FcγRIIIA)而不表現抑制性FcγRIIB。

【0057】表1. 人類FcγR之特性

Fcγ	對偶基因變異體	對人類IgG之親和力	同型偏好	細胞分佈
FcγRI	未描述	高(K_D為約10 nM)	IgG1=3＞4＞＞2	單核細胞、巨噬細胞、經活化之嗜中性白血球、樹突狀細胞？
FcγRIIA	H131	低至中等	IgG1＞3＞2＞4	嗜中性白血球、單核細胞、巨噬細胞、嗜酸性白血球、樹突狀細胞、血小板
	R131	低	IgG1＞3＞4＞2	
FcγRIIIA	V158	中等	IgG1=3＞＞4＞2	NK細胞、單核細胞、巨噬細胞、肥大細胞、嗜酸性白血球、樹突狀細胞?
	F158	低	IgG1=3＞＞4＞2	
FcγRIIB	I232	低	IgG1=3=4＞2	B細胞、單核細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞、肥大細胞
	T232	低	IgG1=3=4＞2	

【0058】「Fc區」(片段可結晶區)或「Fc域」或「Fc」係指Ab之重鏈之C端區，其介導Ig與宿主組織或因子之結合，包括與位於免疫系統之各種細胞(例如，效應細胞)上之FcR或經典補體系統之第一組分(C1q)的結合。因此，Fc區為包含Ab之恆定區(排除第一恆定區Ig域)之多肽。在IgG、IgA及IgD Ab同型中，Fc區由兩個來源於Ab之兩個重鏈的第二(C_{H2})及第三(C_{H3})恆定域之一致蛋白質片段構成；IgM及IgE Fc區在各多肽鏈中之三個重鏈恆定域(C_H域2-4)。對於IgG，Fc區包含Ig域Cγ2及Cγ3以及Cγ1與Cγ2之間的鉸鏈。儘管免疫球蛋白重鏈之Fc區之邊界可變化，但人類IgG重鏈Fc區通常定義為自位置C226或P230處之胺基酸殘基延伸至重鏈之C端，其中編號係根據EU索引，如Kabat中。人類IgG Fc區之C_{H2}域自約胺基酸231延伸至約胺基酸340，而C_{H3}域位於Fc區中的C_{H2}域之C端側，亦即，其自IgG之約胺基酸341延伸至約胺基酸447。如本文中所使用，Fc區可為原生序列Fc或變異型Fc。

【0059】如本文中所使用，「岩藻醣基化」及「非岩藻醣基化」分別係指Ab之位置N297處的N-連接之聚醣上存在及不存在核心岩藻醣殘基。除非另有指示或由上下文清楚，否則Ab之Fc區中之胺基酸殘基編號係根據EU編號慣例(如Kabat等人, 1991中之EU索引)。

【0060】「免疫反應」係指脊椎動物內的針對外來因子之生物反應，該反應保護生物體對抗此等因子及由其所引起之疾病。免疫反應係由免疫系統之細胞(例如，T淋巴細胞、B淋巴細胞、NK細胞、巨噬細胞、嗜酸性白血球、肥大細胞、樹突狀細胞或嗜中性白血球)及由此等細胞中之任一者或肝臟產生的可溶性大分子(包括Ab、細胞介素及補體)之作用介導，該作用引起選擇性靶向、結合於、損害、破壞及/或消除脊椎動物體

內之侵入病原體、感染病原體之細胞或組織、癌性或其他異常細胞，或在自體免疫或病理性炎症之情況下，正常人類細胞或組織。

【0061】 術語「免疫療法」係指藉由包含誘導、增強、抑制或以其他方式改變免疫反應的方法來治療罹患疾病或具有感染或經歷疾病復發之風險的個體。

【0062】 術語「單藥療法」係指單一類型之治療，諸如向患者投與單一藥物，或僅使用放射療法或手術來治療疾病或病狀。若在同一個治療過程中，藥物本身之投藥係在另一類型之用於疾病或病狀之治療(諸如其他藥物之投藥)之前或之後進行，則其不組成單藥療法。

【0063】 相比之下，「組合療法」係指組合至少兩種類型之療法之治療方法，諸如向患者投與兩種或更多種藥物，或投與藥物加放射療法或手術，以治療疾病或病狀。此兩種或更多種治療無需並行地遞送至患者，但仍為同一個治療過程之一部分。在某些實施例中，同時投與不同療法。在其他實施例中，一種療法之投藥與至少一種其他療法之投藥重疊。在其他實施例中，依序投與不同療法。

【0064】 「增強免疫反應」意謂提高個體中之免疫反應之有效性或效能，該免疫反應可為現有的或所誘導之免疫反應。此有效性及效能之提高可例如藉由以下來實現：減少或克服抑制內源性宿主免疫反應之機制、刺激增強內源性宿主免疫反應之機制或增強由免疫治療劑引發之免疫反應。

【0065】 「計劃性死亡-1」(PD-1)係指屬於CD28家族之免疫抑制性受體，其在活體內主要表現於先前經活化之T細胞上，且結合於兩種配位體，即PD-L1及PD-L2。如本文中所使用，術語「PD-1」包括人類PD-1

(hPD-1)、hPD-1之變異體、同功異型物及物種同源物，以及與hPD-1具有至少一個共同抗原決定基之類似物。完整的hPD-1胺基酸序列可在GENBANK®寄存編號U64863中發現。

【0066】「計劃性死亡配位體-1」(PD-L1)為PD-1之兩種細胞表面醣蛋白配位體之一(另一者為PD-L2)，其在結合於PD-1後下調T細胞活化及細胞介素分泌。如本文中所使用，術語「PD-L1」包括人類PD-L1(hPD-L1)、hPD-L1之變異體、同功異型物及物種同源物，以及與hPD-L1具有至少一個共同抗原決定基之類似物。完整的hPD-L1序列可在GENBANK®寄存編號Q9NZQ7中發現。

【0067】「個體」包括任何人類或非人類動物。術語「非人類動物」包括(但不限於)脊椎動物，諸如非人類靈長類動物、羊、犬，及嚙齒動物，諸如小鼠、大鼠及天竺鼠。在較佳實施例中，個體為人類。術語「個體」及「患者」在本文中可互換地使用。

【0068】藥物或治療劑之「治療有效量」或「治療有效劑量」為藥物或藥劑在單獨或與另一治療劑組合使用時，保護個體避免疾病發作或促進疾病消退的任何量，疾病消退係由以下證明：疾病症狀之嚴重程度降低、無疾病症狀期之頻率及持續時間增加、預防或減少由疾病病痛引起之損傷或功能障礙，或以其他方式改善個體中之疾病症狀。此外，關於治療之術語「有效」及「有效性」包括藥理學有效性及生理學安全性。藥理學有效性係指藥物促進患者中之疾病消退，例如癌症消退之能力。生理學安全性係指由藥物之投藥所引起的可接受之程度的毒性，或在細胞、器官及/或生物體層面的其他不良生理學作用(副作用)。治療劑之功效可使用熟習此項技術者已知的各種方法評估，諸如在臨床試驗期間在人類個體中、在

預測人類中之功效的動物模型系統中或藉由在活體外分析法中分析藥劑之活性。

【0069】 作為腫瘤之治療之實例，與未經治療之個體相比，治療有效量之抗癌劑較佳抑制細胞生長或腫瘤生長達至少約20%，較佳至少約40%，更佳至少約60%，甚至更佳至少約80%，且更佳達約100%。可在預測人類腫瘤中之功效的動物模型系統中評估藥劑或治療抑制腫瘤生長之能力，該動物模型系統諸如CT26結腸腺癌、MC38結腸腺癌、SA1N纖維肉瘤、4T1乳癌及MB49膀胱癌小鼠腫瘤模型中之任一者。或者，可使用熟習此項技術者已知的分析法，藉由評估藥劑或治療活體外抑制細胞生長之能力來量測腫瘤生長抑制。在本發明之較佳實施例中，在人類個體中可觀測到腫瘤消退且持續至少約30天，更佳至少約60天或甚至更佳至少約6個月之週期。

【0070】 藥物之治療有效量包括「預防有效量」，其為在單獨或與另一治療劑組合投與具有產生疾病(例如，具有產生癌症之風險的患有癌前病狀之個體)或經歷疾病復發之風險的個體時抑制疾病(例如，癌症)之產生或復發之藥物之任何量。在較佳實施例中，預防有效量完全防止疾病之產生或復發。「抑制」疾病之產生或復發意謂降低疾病之產生或復發的可能性，或完全防止疾病之產生或復發。

【0071】 個體之「治療」或「療法」係指對個體進行之任何類型之介入或方法，包括投與活性劑，其目標為逆轉、緩解、改善、抑制、減緩或預防與疾病相關聯之症狀、併發症或病狀或生物化學標誌之發作、進展、發展、嚴重程度或復發。

【0072】 如本文中所使用，不定冠詞「一」應理解為指任何所敍述

或列舉之組分中之「一或多者」。

【0073】 當應用於數值時，術語「約」係指合理地近似於所述值且在如由一般熟習此項技術者所確定之可接受的誤差範圍內之值，該可接受的誤差範圍將部分取決於如何量測或測定該值，亦即，量測系統之極限。舉例而言，「約」可意謂所述參考值之加或減50%之範圍，較佳加或減25%之範圍，或更佳加或減10%之範圍。當在本申請案中提供特定值時，除非另有說明，否則「約」之含義應理解為在該特定值的根據此項技術中之實踐的可接受之誤差範圍內。

【0074】 術語「實質上相同」或「基本上相同」係指兩個或更多個數值、組合物或特徵之間的足夠高的相似度，使得熟習此項技術者將認為此等值、組合物或特徵之間的差異在所量測之特性之情形下將存在極小或不存在生物學及/或統計顯著性。所量測之數值數之間的差異可例如小於約50%，較佳小於約25%，且更佳小於約10%。

【0075】 如本文中所描述，除非另有指示，否則任何濃度範圍、百分比範圍、比率範圍或整數範圍應理解為包括在所述範圍內之任何整數值及(在適當時)其分數(諸如整數之十分之一及百分之一)。

【0076】 在以下子部分中進一步詳細描述本發明之各種態樣。

【0077】

高免疫抑制性腫瘤浸潤性Treg中之CCR8之特異性表現

本文中報導之各種實驗說明CCR8由人類腫瘤中之Tregs特異性表現，且與CCR4 (一種當前正在經歷臨床試驗之Treg消耗目標)不同，CCR8在抑制性腫瘤Treg上選擇性表現且在促炎性Teff上極少表現。癌症基因體圖譜(TCGA；國家癌症研究所(National Cancer Institute), 2021)中

之人類*CCR8*及*FOXP3*基因-基因相關性之分析(實例1)表明在大部分癌症類型中，CCR8表現與FOXP3 (Treg之主要轉錄調節因子)具有最高相關性(圖1A)。CCR8表現於腫瘤FOXP3^{hi} Tregs上，但在周邊血液中之Treg及Teff上很少觀測到。CCR8亦選擇性地表現於HCC腫瘤樣品中之FOXP3^{hi}淋巴細胞上，但未在患者腫瘤中之FOXP3^{mid}及FOXP3^{neg} CD8以及CD4 Teff中表現(圖1B)。CCR8表現與較高的FOXP3表現量及Treg之標準標記物(IL2RA、IKZF2、BATF)含量相關聯，而較低的CCR8表現與細胞毒性T細胞標記物(GZMA、CD8A；圖1C)相關聯。

【0078】 比較不同的Treg相關分子之表現概況(實例3)，證實與來自患者匹配血液之Treg相比，CCR8在腫瘤相關FOXP3$^+$ Treg上更多地表現，而來自腫瘤及血液之Treg上之CCR4、CTLA-4及CD25之表現存在極小差異(圖2A)。與周邊血液Treg相比，FOXP3$^+$腫瘤Treg上的CCR8之以每個細胞計之高豐度(圖2B)與腫瘤及周邊血液中之CD4$^+$ Tconv (圖2C及D)及CD8$^+$ T細胞(圖2E及F)上的CCR8表現之低出現率共同表明，CCR8代表在較低的損害抗腫瘤Teff細胞群體之風險下靶向腫瘤Treg之高選擇性治療性標記物。

【0079】 與人類腫瘤相關聯之T淋巴細胞之不同子集中的CCR8之表現量之流式細胞分析(實例4)表明CCR8由大部分腫瘤駐留Treg表現(中值為82%)，如由FOXP3所定義(圖3A)。相比之下，顯著較低比例之腫瘤浸潤性CD4$^+$ T細胞及CD8$^+$ T細胞表現CCR8 (中值分別為12.65%及4.55%；圖3B)。儘管一小部分CD4 Tconv細胞表現CCR8，但Treg上之以每個細胞計的CCR8之表現量明顯高於CD4 Tconv細胞(中值MFI 2106對比132，P<0.0001)，而CD8$^+$ T細胞之CCR8表現量係可忽略的(圖3B)。亦證實周

邊血液中之Treg表現CCR8，但明顯低於腫瘤浸潤性Treg上之表現量(圖3C)。

【0080】亦藉由流式細胞測量術來分析CCR8在不同人類Treg亞群上之差異性表現(實例5)。在來自健康個體之PBMC中，發現CCR8主要表現於周邊血液Treg上，但與腫瘤浸潤性Treg上之表現(中值為約82%)(參考圖3A)相比，僅在一小部分(中值為21%)此等周邊Treg上表現(圖4A)。因此，歸因於周邊Treg群體中之$CCR8^+$ Treg之比例較低，抗CCR8 Ab介導之細胞消耗可能不會顯著影響周邊Treg腔室。此暗示與不加區別的非腫瘤相關Treg之消耗相比，與藉由靶向CCR8來消耗腫瘤相關Treg相關聯的自體免疫毒性之風險較低。在Treg群體內，CCR8在效應子記憶體群體中更多地表現且在中心記憶細胞中之表現量較低，且原生Treg (圖4B)或習知$CD4^+$ T細胞(圖4C)上表現極少的CCR8。在癌症患者中，以每個細胞計，腫瘤浸潤性Treg上之CCR8表現高於來自周邊血液之Treg，如藉由經結合之抗CCR8 Ab之MFI所量測(圖4D)。

【0081】與臨床上的其他靶向Treg之nf藥劑(CCR4-莫格利珠單抗(mogamulizumab)及CTLA-4-Ipi-nf)相比，CCR8在與不良存活率相關聯之$FOXP3^{hi}$腫瘤Treg之活化程度及免疫抑制性最高之子集上特異性表現(Plitas等人, 2016；Wang等人, 2019)，有效排除表現顆粒酶及其他效應細胞介素之Teff。將兩種黑素瘤腫瘤及一種RCC腫瘤針對FOXP3及CCR8表現進行解離及染色(實例6)。圖5表明CCR8在代表活化程度最高之Treg的免疫抑制性最高之$CD4^+$ $FOXP3^{high}$ Treg群體上表現。在存在明顯的$FOXP3^{mid}$群體之黑素瘤樣品中，在$FOXP3^{high}$ T細胞中發現大部分CCR8表現，其中CCR8表現量明顯低於$FOXP3^{mid}$及$FOXP3^{neg}$腫瘤T細胞，該等

T細胞主要為表現顆粒酶及其他效應細胞介素之效應細胞。在大部分患者FOXP3$^+$ T細胞呈現高FOXP3含量之RCC樣品中，CCR8表現與FOXP3表現重疊。與可為經活化之習知T細胞或靜止Treg之FOXP3^{mid} CD4$^+$ T細胞形成對比，已證實FOXP3^{high} CD4$^+$ T細胞為真正的Treg。

【0082】 檢驗CCR8$^+$對比CCR8$^-$腫瘤浸潤性T細胞群體中之功能相關分子之表現(實例7)。證實來自患者腫瘤樣品之CCR8$^+$細胞共同表現具有潛在免疫抑制功能之若干蛋白質，諸如CD25、IL1R2及CD39 (圖6A-D)，而未在CCR4$^+$ T細胞中發現類似的富集作用(圖7A-D)。使用HLA-DR作為活化標記物，CCR8表現亦與高HLA-DR表現量相關(圖8A)且因此鑑別經活化之Treg，而CCR4表現並非如此(圖8B)。因此，CCR8$^+$細胞之消耗將移除表現CD25、CD39及IL1R2之經活化之免疫抑制性Treg，而CCR4靶向消耗將不會移除表現此等分子之Treg。此外，在CD4$^+$ T細胞之CCR8$^+$部分中，用佛波醇(phorbol)12-豆蔻酸13-乙酸(PMA)及離子黴素離體刺激經解離之患者腫瘤細胞誘導最小的IL-2、IFNγ及顆粒酶B產生(圖9A-C)。相比之下，CCR4$^+$CD4$^+$ T細胞為IFNγ及IL-2之主要生產者(圖10A及B)，表明CCR4$^+$而非CCR8$^+$細胞之靶向消耗可能對抗腫瘤免疫不利。

【0083】 實例1-7中揭示及以上概述之資料表明，並非腫瘤中之所有CD4$^+$FOXP3$^+$ T細胞皆表現CCR8，且CCR8$^+$部分似乎代表FOXP3$^+$細胞之免疫抑制性較高之子集。因此，CCR8表現將腫瘤中富集之高抑制性Treg之子集標記且可阻礙抗腫瘤免疫。CCR8表現對腫瘤特異性Treg且特定言之，活化程度及免疫抑制性最高的CD4$^+$ FOXP3^{high}瘤內Treg之高特異性使得CCR8成為使用抗CCR8 Ab經由ADCC來介導此等高免疫抑制性

Treg之消耗之最佳目標。

【0084】 因此，在本文中所描述之實驗中產生抗hCCR8 mAb (實例8)且進行篩選，以鑑別呈現用於治療癌症之治療性Ab所需的多種特性之Ab (實例9-31)。本文中證明，替代性小鼠抗mCCR8-mIgG2a Ab在多種小鼠腫瘤模型中有效抑制腫瘤生長，且未經岩藻醣基化(nf)之抗hCCR8 Ab在離體患者腫瘤樣品中及活體外消耗人類腫瘤Treg，同時避開驅動抗腫瘤免疫反應之促炎性$CD4^+$及$CD8^+$ Teff細胞(實例20及22)。消耗腫瘤相關Treg可降低其免疫抑制作用且藉此增強整體免疫反應以對抗癌症。此外，因為CCR8極少在周邊血液或其他組織中之Treg及Teff上表現，因此靶向Treg可產生最小的毒性風險。相比之下，活體外抗hCCR4-IgG1-nf治療引起周邊及腫瘤微環境中之Treg及$CD4^+$ Tconv細胞之消耗(實例20及22)。此與莫格利珠單抗(抗CCR4)在臨床上消耗周邊血液中之Teff群體之證據(Kurose等人, 2015)一致。

【0085】

產生抗hCCR8 MAb

趨化介素受體，包括CCR8，由於其在細胞表面上不引人注意且相對難以實現Ab結合而在傳統上為「極難以研發針對其之Ab之抗原」(WO 2007/044756)。又，所產生之針對肽(對應於趨化介素受體之胞外域)之Ab通常不能識別細胞上之完整受體，此很可能係由於二級結構中之差異。歸因於此等困難，產生針對趨化介素受體之Ab之工作之成功率較低(WO 2007/044756)。CCR8為尤其困難的GPCR，其已被描述為「極具挑戰性」的產生針對其之Ab之目標(Harbour BioMed, 2020)。

【0086】 藉由用hCCR8表現細胞對小鼠進行免疫接種來產生抗

hCCR8 Ab之最初成果並不成功。然而，在嘗試用各種hCCR8抗原及此等抗原之各種組合對不同嚙齒動物進行免疫接種之後，在本發明之研究中產生抗hCCR8 mAb (實例8)。

【0087】

嚙齒動物之免疫接種

藉由用免疫原對不同嚙齒動物(包括常規C57BL/6小鼠、表現人類Ig譜系之轉基因小鼠之不同品系、特異性產生之$CCR8^{-/-}$基因剔除小鼠品系、大鼠及倉鼠)進行免疫接種來產生人類化或人類抗CCR8 mAb，該等免疫原包含各種hCCR8抗原，包括過表現hCCR8之中國倉鼠卵巢(CHO)、小鼠BAF3及人類HEK 293F細胞或來自此等細胞之經純化之質膜。用化學合成肽對此等免疫原進行增強免疫，該等化學合成肽係來自與牛血清白蛋白(BSA)或匙孔螺血氰蛋白(KLH)結合之hCCR8 N端(hCCR8之殘基1-35)，該N端之重要之處在於在位置15及/或17處含有經單或雙硫酸化之酪胺酸殘基。接著，將非轉基因小鼠中產生之某些mAb修飾成人類化或嵌合衍生物。

【0088】 蛋白質通常顯示轉譯後修飾，其中一些(例如，醣基化)已被極充分地研究及證明。相比之下，極少研究某些細胞外酪胺酸殘基之硫酸化且迄今為止，僅存在32種被證明含有硫酸化酪胺酸之經確認之分子(Mehta等人, 2020)。儘管尚待發現其他具有硫酸化酪胺酸之蛋白質，但預計硫酸化酪胺酸極稀少(Moore, 2003)。作為化學部分，其與所有其他胺基酸明顯不同且因此代表用於產生具有極高特異性及低脫靶結合之極佳焦點。包括CCR8之趨化介素受體組成已被充分證明在N端上具有硫酸化酪胺酸之極少數蛋白質類別中之一種(Ludeman及Stone, 2014)。對於若干

種此等受體，已發現酪胺酸硫酸化對於配位體(亦即，趨化介素)接合而言為重要的(Zhu等人, 2011)。因此，有可能的是，與酪胺酸硫酸鹽接合之Ab將破壞趨化介素與趨化介素受體之間的結合且藉此阻止趨化介素受體活化。如本文中之其他地方所論述，尤其關注本發明之結合於抗原決定基之Ab，該抗原決定基包含具有序列$V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)之肽內的至少一個胺基酸，例如，包含具有序列$V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)之肽內的2、3、4、5、6、7、8、9、10個或所有胺基酸且特定言之，其中胺基酸Y15及Y17經硫酸化，且實例11展示mAb 4A19以約1.6 nM之K_D結合於經雙硫酸化之CCR8 N端(參見表5)。

【0089】

抗CCR8 mAb之減少之岩藻醣基化、非岩藻醣基化及低岩藻醣基化

可藉由修飾在N297殘基(EU編號)處連接至各Fc片段之聚醣部分來增強Ab與FcγR之相互作用。特定言之，經由在不改變抗原結合或補體依賴性細胞毒性(CDC；Natsume等人, 2009)之情況下的IgG與活化性FcγRIIIA之經改良之結合，缺少核心岩藻醣殘基可顯著增強ADCC。nf Ab與人類Treg上之CCR8之結合可促進NK細胞上之FcγR與骨髓單核細胞性Teff之接合。此FcγR接合驅動NK細胞活化，引起增強之藉由ADCC進行之Treg殺傷。存在有說服力的證據表明去岩藻醣基化腫瘤特異性Ab在活體內小鼠模型中轉譯成增強之治療活性(Nimmerjahn及Ravetch, 2005；Mossner等人, 2010)。

【0090】 Ab醣基化之修飾可藉由例如在具有經改變之醣基化機構的宿主細胞中表現Ab來實現。本文中所揭示之某些抗hCCR8 mAb具有降低

或消除之岩藻醣基化且呈現增強之ADCC，其尤其適用於本發明之方法。因此，本文中所揭示之抗hCCR8 mAb可以具有降低或消除之岩藻醣基化之形式產生(例如，藉由在具有經改變之醣基化機構之細胞中表現抗hCCR8 mAb)且因此呈現增強型之ADCC，其尤其適用於本發明之方法。具有經改變之醣基化機構的細胞已描述於此項技術中，且可用作表現本發明之重組Ab以藉此產生具有經改變之醣基化之Ab (例如，mAb)的宿主細胞。舉例而言，細胞株Ms704、Ms705及Ms709不具有岩藻醣基轉移酶，FUT8 (α-(1,6)岩藻醣基轉移酶；參見美國公開案第2004/0110704號；Yamane-Ohnuki等人, 2004)，使得此等細胞株中表現之Ab在其碳水化合物中不具有岩藻醣。EP 1176195亦描述具有功能性破壞之FUT8基因的細胞株以及具有極少或沒有用於將岩藻醣添加至N-乙醯基葡糖胺(其與Ab之Fc區結合)之活性的細胞株，例如，大鼠骨髓瘤細胞株YB2/0 (ATCC CRL 1662)。此項技術中已描述許多其他用於在具有降低之岩藻醣基化之Ab的情況下製備Ab之方法。藉由不具有岩藻醣基化所必需的FUT8酶之Expi293 Fut8$^{-/-}$基因剔除細胞(Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA)中之表現來產生本文中所揭示之低岩藻醣基化或nf嵌合、人類化或人類抗hCCR8 Ab。

【0091】 因為nf Ab與岩藻醣基化Ab相比呈現顯著增強之ADCC，Ab製劑無需完全不含岩藻醣基化重鏈即可用於本發明之方法中。岩藻醣基化重鏈之殘基含量將不會顯著干擾實質上nf重鏈之製劑之ADCC活性。在完全勝任將核心岩藻醣添加至N-聚醣之習知CHO細胞中產生的Ab仍可包含百分之幾至15%之nf Ab。nf Ab可呈現約10倍更高的對CD16之親和力，及ADCC活性之高達30至100倍增強，因此即使nf Ab之比例之少量增

加亦可顯著提高製劑之ADCC活性。在培養物中，任何包含與正常CHO細胞(例如，具有未經改變之醣基化機構之野生型CHO細胞)中所產生的相比更多的nf Ab之製劑可呈現某一程度之增強之ADCC。此類Ab製劑在本文中被稱為具有降低之岩藻醣基化之製劑。取決於自正常CHO細胞(例如，野生型CHO細胞)獲得之原始非岩藻醣基化程度，降低之岩藻醣基化製劑可包含少至50%、30%、20%、10%及甚至5% nf Ab。降低之岩藻醣基化可在功能性上定義為與在正常CHO細胞中製備之Ab相比且不參考nf物質之任何固定百分比，呈現約2倍或更大的ADCC之增強之製劑。

【0092】 然而，如本文中所使用，除非另有指示，否則在結構上定義非岩藻醣基化程度。特定言之，「未經岩藻醣基化」(nf)或「去岩藻醣基化」(同義使用之術語)之Ab製劑為包含大於95% nf Ab重鏈(包括100%)之Ab製劑；「低岩藻醣基化」係指其中80至95%的重鏈不具有岩藻醣之Ab製劑；且「低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化」係指其中80%或更多的重鏈不具有岩藻醣之Ab製劑。

【0093】 Ab製劑之岩藻醣基化程度可藉由此項技術中已知的方法測定，包括(但不限於)凝膠電泳、液相層析(LC)及質譜(MS)。出於本發明之目的，除非另有指示，否則Ab製劑之岩藻醣基化程度係藉由親水相互作用層析(或親水相互作用液相層析，HILIC)測定。為了測定Ab製劑之岩藻醣基化程度，用PNGase F對樣品進行變性處理以使N-連接之聚醣裂解，接著分析岩藻醣含量。全長Ab鏈之LC/MS為用於偵測Ab製劑之岩藻醣基化程度之替代性方法，但質譜之定量性固有地較小。

【0094】

治療性抗hCCR8 mAb必須具有高ADCC潛力

由於吾人在初步免疫接種實驗中產生抗CCR8 Ab時遇到的極大困難，最終如上文及實例8中所描述用多種抗原進行免疫接種。如實例9中所描述來篩選所產生之融合瘤，以確認結合於CCR8及CCR8 N端肽之Ab。如實例10中所描述將所選擇的小鼠Ab人類化。

【0095】 亦提供用於產生針對CCR8之Ab之方法，該方法包含在包含一或多次免疫接種之免疫接種計劃表中用一或多種hCCR8抗原將嚙齒動物免疫接種至少一次，其中免疫接種計劃表在至少一次免疫接種中包括投與hCCR8抗原，該抗原為包括hCCR8之殘基Y15及Y17且其中殘基Y15及Y17為磺基酪胺酸殘基之KLH結合之hCCR8肽。較佳地，殘基Y15及Y17皆為磺基酪胺酸殘基。

【0096】 視情況地，hCCR8肽至少包含hCCR8之N端之最末尾處的25、30或35個胺基酸或由其組成。視情況地，hCCR8肽由hCCR8之N端之最末尾處的35個胺基酸組成。

【0097】 視情況地，嚙齒動物為小鼠、大鼠或倉鼠。較佳地，嚙齒動物為小鼠。

【0098】 視情況地，在至少一次免疫接種中用表現hCCR8之細胞或較佳地，自表現CCR8之細胞分離之質膜富集部分(單獨或與KLH結合之hCCR8肽組合)對嚙齒動物進行免疫接種。視情況地，免疫接種計劃表包括用表現hCCR8之HEK 293F細胞及用KLH結合之N端hCCR8肽對嚙齒動物進行免疫接種。視情況地，免疫接種計劃表包括用表現hCCR8之BAF3細胞之質膜富集部分及用KLH結合之hCCR8肽對嚙齒動物進行免疫接種。

【0099】 在某些態樣中，本發明係關於經分離之Ab，較佳mAb，或

其抗原結合部分，其特異性結合於表現於細胞表面上之CCR8且介導藉由ADCC進行之CCR8表現細胞之消耗。在某些實施例中，與mAb或其抗原結合部分結合之CCR8為hCCR8，其序列係如SEQ ID NO:1所闡述。在其他實施例中，CCR8為mCCR8，其序列係如SEQ ID NO:120所闡述。

【0100】 人類IgG1及IgG3 Ab同型能夠經由結合於Fcγ受體，特定言之，由人類NK細胞及單核細胞表現之CD16 (FcγRIIIa)受體來介導ADCC (參見表1)。許多商品化之治療性Ab具有人類IgG1同型，其在與其他人類Ab同型相比時可誘導強ADCC及CDC。此外，治療性IgG1 Ab在血液中具有經由結合於新生Fc受體(FcRn)而介導之長期穩定性。若干治療性Ab (包括抗CD20利妥昔單抗(rituximab)(RITUXAN®)(Dall'Ozzo等人, 2004)、抗Her2曲妥珠單抗(trastuzumab)(HERCEPTIN®)(Gennari等人, 2004)、抗腫瘤壞死因子-α (抗TNF-α)英利昔單抗(infliximab)(REMICADE®)(Louis等人, 2004)及抗RhD (Miescher等人, 2004))之活性係至少部分由ADCC介導。

【0101】 在所揭示之本發明之某些實施例中，抗CCR8 mAb或其抗原結合部分包含具有人類IgG1或IgG3同型之重鏈恆定區。在較佳實施例中，抗CCR8 mAb或其抗原結合部分具有人類IgG1。

【0102】 本發明亦提供包含經修飾之重鏈恆定區之經修飾之抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分，其與相應的未經修飾之mAb或其抗原結合部分相比以較高親和力結合於FcγR且介導增強之ADCC。在某些實施例中，經修飾之抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分至少介導：(a)增強約2倍之ADCC活性；(b)增強約5倍之ADCC活性；(c)增強約10倍之ADCC活性；(d)增強約30倍之ADCC活性，或(e)增強約100倍之ADCC活性，例如

藉由NK細胞溶解分析法(例如，實例17中描述之NK細胞溶解分析法)中的細胞溶解之EC_{50}之降低所量測。在某些實施例中，經修飾之抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分包含經修飾之IgG1重鏈恆定區，其呈現降低之岩藻醣基化作用。

【0103】 在其他實施例中，經修飾之抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分包含低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之經修飾之IgG1重鏈恆定區。在某些其他實施例中，經修飾之mAb或其抗原結合部分包含經修飾之IgG1重鏈恆定區，該重鏈恆定區含有介導增強之ADCC之一種突變或多種突變。在其他實施例中，該突變或多種突變係選自：G236A；S239D；F243L；E333A；G236A/I332E；S239D/I332E；S267E/H268F；S267E/S324T；H268F/S324T；G236A/S239D/I332E；S239D/A330L/I332E；S267E/H268F/S324T；及G236A/S239D/A330L/I332E。在某一實施例中，經修飾之抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分包含低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之經修飾之IgG1重鏈恆定區，且進一步含有介導增強之ADCC之一種突變或多種突變，諸如上文所列舉。

【0104】

介導ADCC之抗hCCR8 MAb之功能性篩選

在功能上篩選人類、人類化及嵌合抗hCCR8 mAb純系以鑑別呈現治療性Ab所需之特性之Ab，包括滿足以下條件之Ab：以高親和力結合於hCCR8 (實例11)；特異性結合於表現CCR8之人類細胞(實例14)；阻斷CCL1配位體與CCR8之結合(實例15)；在結合於CCR8表現細胞之表面上的CCR8時，介導此類細胞(包括Treg)之ADCC (實例17、19及20)；不引

起細胞CCR8之內化(實例21)；在活體外(實例22)及離體人類腫瘤切片樣品(實例20)中促進人類腫瘤相關Treg之消耗；特異性介導腫瘤Treg之消耗，同時避開正常組織中之$CCR8^+$ T細胞(實例24)；及當以單藥療法形式或與檢查點抑制劑組合投與小鼠時，降低臨床前小鼠腫瘤模型中之腫瘤生長(實例23-29)。

【0105】 在初步證實以亞奈莫耳EC_{50}值結合於人類細胞上之CCR8且在與不表現CCR8之不同人類組織不具有交叉反應性之情況下特異性結合於CCR8表現細胞之後，選擇用於進一步表徵之純系。藉由下一代定序來對編碼此等Ab中之可變區之DNA進行定序且基於序列同源性及有限的潛在序列可靠性(例如，天冬醯胺去醯胺化、甲硫胺酸氧化及醣基化位點)，針對多樣性來選擇純系。基於其介導CCR8表現細胞之ADCC之效能、結合動力學及序列家族多樣性，針對認為治療性Ab所需之功能來進一步測試某些所選擇之純系mAb，包括抑制小鼠腫瘤模型中之腫瘤生長之能力，且經歷序列最佳化以減少序列可靠性、最佳化結合親和力及恢復生殖系胺基酸。亦經由各種手段來分析所選擇之mAb之生物物理學特性，該等手段諸如分析型尺寸排阻層析、毛細管等電聚焦、疏水性評估、熱穩度及聚集潛力，以鑑別適用於進一步研究之純系。

【0106】

抗CCR8 mAb對CCR8之結合親和力之表徵

本發明之某些抗CCR8 mAb以高親和力結合於hCCR8。Ab通常以高親和力特異性結合於其同源抗原，由1 pM至10 pM或更低之解離常數(K_D)反映。通常認為任何大於約100 pM之K_D指示非特異性結合。如本文中所使用，「特異性結合」於抗原之IgG Ab係指以高親和力結合於抗原及實質

上一致抗原，但不以高親和力結合於不相關抗原之Ab，高親和力意謂具有約100 nM或更低，較佳約10 nM或更低，更佳約5 nM或更低且甚至更佳在約5 nM與0.1 nM之間或更低之K_D。若抗原呈現與既定抗原之高度序列一致性，例如，若其呈現與既定抗原之序列之至少80%、至少90%、較佳至少95%、更佳至少97%或甚至更佳至少99%序列一致性，則其與既定抗原「實質上一致」。

【0107】 如本文中所使用，術語「K_D」意指特定Ab-抗原相互作用之解離常數，其係由k_{off}與k_{on}之比率(亦即，k_{off}/k_{on})獲得且以莫耳濃度(例如，nM)表示。術語「k_{on}」係指Ab與其抗原之結合相互作用之結合速率或「進行速率(on rate)」，而術語「k_{off}」係指Ab-抗原複合物之解離速率。可使用此項技術中公認之方法測定Ab之K_D值，諸如表面電漿子共振(SPR)、動力學排除分析法(KinExA®；Sapidyne Instruments, Boise, ID)或生物層干涉術(BLI；ForteBio, Fremont, CA)。藉由不同方法測定之單一Ab之K_D值可顯著不同，例如，高達1,000倍。因此，在比較不同Ab之K_D值時，重要的是，此等K_D值係使用相同方法測定。在未明確陳述時且除非上下文另有指示，否則本文中所揭示之Ab結合之K_D值係使用BIACORE®生物感測器系統(GE Healthcare, Chicago, IL)藉由SPR測定。

【0108】 亦可藉由測定與表現CCR8之細胞株之結合之EC_{50} (其為實現最大結合之一半的Ab之濃度)來量測與目標(諸如hCCR8)結合的Ab之結合親和力。mAb與表現CCR8之CHO、293F、Raji細胞株之結合之研究呈現低於1 nM之EC_{50} (圖11A)。當與經活化之Treg結合時，此等Ab呈現更廣泛範圍之結合親和力，其中小於一半的Ab呈現在小於1 nM之EC_{50}下之結合(圖11A)。圖11B中展示的所選擇之mAb集合呈現在皮莫耳至奈莫耳

範圍內之EC_{50}。

【0109】因此，在所揭示之本發明之某些實施例中，抗CCR8 mAb或其抗原結合部分按以下EC_{50}特異性結合於表現人類CCR8之CHO細胞：約10 nM或更低；較佳約5 nM或更低；較佳約2 nM或更低；更佳約1.7 nM或更低；更佳約1 nM或更低；更佳約0.5 nM或更低；及甚至更佳約0.1 nM或更低。在某些較佳實施例中，抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分以約0.1 nM之EC_{50}結合於表現hCCR8之CHO細胞。在某些其他較佳實施例中，抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分以約1.7 nM之EC_{50}結合於表現hCCR8之CHO細胞。在某些實施例中，mAb以約0.1 nM與約10 nM之間的EC_{50}結合。在某些其他實施例中，EC_{50}在約0.1 nM與約2 nM之間。在某些其他實施例中，EC_{50}在約0.5 nM與約5 nM之間。在某些較佳實施例中，EC_{50}在約1 nM與約2 nM之間。在其他實施例中，mAb或其抗原結合部分以約0.5 nM與約1 nM之間的EC_{50}結合於人類hCCR8。在某些較佳實施例中，藉由實例11中描述之結合分析法來量測EC_{50}值。

【0110】在本發明之某些其他實施例中，抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分按以下EC50特異性結合於經活化之人類Treg：約50 nM或更低、約14 nM或更低、約10 nM或更低；較佳約5 nM或更低；更佳約2 nM或更低；更佳約0.5 nM或更低；更佳約0.3 nM或更低；甚至更佳約0.1 nM或更低；且更佳約0.03 nM或更低。在某些較佳實施例中，抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分以約1.7 nM之EC_{50}結合於表現hCCR8之CHO細胞。在某些實施例中，mAb以約0.03 nM與約10 nM之間的EC_{50}結合。在某些較佳實施例中，EC_{50}在約0.1 nM與約5 nM之間。在更佳實施例中，mAb或其抗原結合部分以約0.2 nM與約2 nM之間的EC_{50}結合於人類hCCR8。在某些

較佳實施例中，藉由實例11中描述之結合分析法來量測EC_{50}值。

【0111】 藉由X射線結晶學證實，所選擇的抗hCCR8 mAb (4A19)之Fab片段結合於抗原決定基，該抗原決定基包含hCCR8之N端肽中之殘基15-21 (實例11)及抗原決定基之中心處的硫酸化酪胺酸-17殘基(圖12A)。因此，在某些實施例中，本文中所描述之抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分結合於人類CCR8之N端抗原決定基，如藉由X射線結晶學所測定，其中抗原決定基包含具有序列$Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$ (SEQ ID NO:2)之肽內之至少一個胺基酸。在某些較佳實施例中，抗原決定基肽包含硫酸化酪胺酸-17殘基。在某些實施例中，抗原決定基包含具有SEQ ID NO:2之序列的肽內之2、3、4、5、6個或全部胺基酸。

【0112】 雙硫酸化肽(Y15及Y17硫酸化)與4A19 Fab片段之結合證實抗原決定基之中心之一致性及定向。其亦實現包含hCCR8之N端殘基12-22 (VTDYYYPDIFS；SEQ ID NO:109)之延伸度更高的線形抗原決定基之定界(圖12B)。抗原決定基自由單硫酸化肽揭示之一者之延伸可能為將hCCR8 N端肽之較大區段排序之磺酸基-Y15之結果，實現其與4A19 Ab之相互作用之觀測。在具有雙硫酸化肽之結構中觀測到的抗原決定基序列可組成由mAb 4A19結合之整個抗原決定基，因為此Ab係使用涉及多次免疫接種之免疫接種策略產生，該多次免疫接種係用hCCR8 N端肽進行以增強對hCCR8 N端之免疫反應。若N端肽中之其他胺基酸殘基形成抗原決定基之一部分，則此將可能在晶體結構中發現，但其並非如此(圖12B)。

【0113】 因此，在某些較佳實施例中，由4A19結合之抗原決定基肽包含硫酸化酪胺酸-15及酪胺酸-17殘基。在某些實施例中，此肽之胺基酸Y_{15}及/或Y_{17}經硫酸化。在某些較佳實施例中，此肽之胺基酸Y_{15}及Y_{17}皆

經硫酸化。

【0114】 本發明提供一種Ab，例如mAb，或其抗原結合部分，其能夠介導ADCC且特異性結合於hCCR8 (其序列如SEQ ID NO:1所闡述)上之抗原決定基，其中抗原決定基位於hCCR8之N端域中，該N端域在跨越約胺基酸殘基15至21之肽($Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$；SEQ ID NO:2)內，如藉由X射線結晶學所測定。在某一實施例中，抗原決定基包含具有序列$Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$ (SEQ ID NO:2)之肽內之至少一個胺基酸。在其他實施例中，抗原決定基包含具有序列$Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$ (SEQ ID NO:2)之肽內之2、3、4、5、6個或全部胺基酸。在某些較佳實施例中，抗原決定基包含具有SEQ ID NO:2之序列之全部7個胺基酸。

【0115】 本發明亦提供一種Ab，例如mAb，或其抗原結合部分，其能夠介導ADCC且特異性結合於hCCR8 (其序列如SEQ ID NO:1所闡述)上之抗原決定基，其中抗原決定基位於hCCR8之N端域中，該N端域在跨越約胺基酸殘基12至22之肽($V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$；SEQ ID NO:109)內，如藉由X射線結晶學所測定。在某一實施例中，抗原決定基包含具有序列$V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)之肽內之至少一個胺基酸。在其他實施例中，抗原決定基包含具有序列$V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)之肽內之2、3、4、5、6、7、8、9、10個或全部胺基酸。在某些較佳實施例中，抗原決定基包含具有SEQ ID NO:109之序列之全部11個胺基酸。在某些其他實施例中，抗原決定基由具有SEQ ID NO:109之序列之肽組成。

【0116】 在本發明之某些態樣中，抗CCR8 mAb或其抗原結合部分按以下K_D結合於包含硫酸化tyr-15及tyr-17殘基之hCCR8之N端肽(例如，

在位置tyr-15及tyr-17處硫酸化之N端CCR8殘基1-35之肽(CCR8-2磺基))：約100 nM或更低；較佳約50 nM或更低；較佳約10 nM或更低；更佳約5 nM或更低；更佳約1.6 nM或更低；更佳約1.0 nM或更低；且甚至更佳約0.5 nM或更低；且更佳約0.1 nM或更低。在某些較佳實施例中，抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分以約1.6 nM之K_D結合於N端抗原決定基肽，例如，在位置Tyr15及Tyr17處硫酸化之N端CCR8殘基1-35之肽(CCR8-2磺基))。在某些實施例中，mAb以約100 nM與約0.1 nM之間的K_D結合。在某些較佳實施例中，K_D在約50 nM與約0.5 nM之間。在更佳實施例中，mAb或其抗原結合部分以約10 nM與約1 nM之間的K_D結合。在更佳實施例中，mAb或其抗原結合部分以約2 nM與約1 nM之間的K_D結合。在某些較佳實施例中，藉由實例11中所描述之SPR方法來量測K_D值。

【0117】 4A19 Ab之結合需要hCCR8之N端中的酪胺酸(tyr-15及tyr-17)之硫酸化(參見實例11)。若僅一個酪胺酸殘基，即tyr-15磺基化，則4A19 Fab片段與N端肽不太緊密地結合，由高超過10倍且比雙硫酸化之肽高約1,000倍之K_D證明，而若僅tyr-17經硫酸化，則存在親和力之約10倍降低(表5)。因此，本發明提供一種抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分，其按以下方式結合於包含單一硫酸化殘基(tyr-17)之hCCR8 (CCR8-磺基Y17)之N端肽：約100 nM或更低；較佳約50 nM或更低；較佳約25 nM或更低；更佳約10 nM或更低；且甚至更佳約1.0 nM或更低。在某些較佳實施例中，抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分以約20 nM之K_D結合於經單磺基化之抗原決定基肽。在某些實施例中，mAb以約100 nM與約1 nM之間的K_D結合。在某些較佳實施例中，K_D在約50 nM與約10 nM之間。在更佳

實施例中，mAb或其抗原結合部分以約30 nM與約20 nM之間的K_D結合。在某些較佳實施例中，藉由實例11中所描述之SPR方法來量測K_D值。

【0118】

抗hCCR8 MAb之組織交叉反應

因為將使用治療性抗CCR8 mAb消耗表現CCR8之目標細胞，重要的是，mAb特異性結合於所欲目標細胞，亦即，腫瘤浸潤性Treg，且不與身體中之其他必需的細胞類型結合，該等必需的細胞之消耗將誘導毒性或不合需要的副作用。因此，針對與多種正常人類組織類型之結合來測試候選mAb(實例14)。證實抗hCCR8 mAb 18Y12及4A19與主要在胸腺之髓質及皮膚之真皮中的稀少及分散的免疫細胞結合，而在所檢驗之許多其他組織中未觀測到結合。觀測到另一種mAb，16B13，非特異性結合於PBMC及各種人類組織，包括淋巴器官及富含淋巴之組織中之免疫細胞，且結合於其中存在免疫細胞之許多組織。染色呈現細胞質模式。非特異性結合於細胞表面上之除CCR8以外的目標之Ab (諸如16B13)儘管可呈現其他合乎需要的功能特性，但其不適用於靶向CCR8表現細胞以進行消耗之治療用途。

【0119】 因此，本發明提供一種抗CCR8 mAb或其抗原結合部分，其特異性結合於CCR8表現細胞(諸如腫瘤Treg)以及胸腺之髓質及皮膚之真皮中之稀少及分散的免疫細胞，但不與多種人類組織(包括大腦、小腦、心臟、肝臟、肺、腎臟、扁桃體、脾、胸腺、結腸、胃、胰臟、腎上腺、垂體、皮膚、周邊神經、睪丸或子宮組織，或PBMC)結合。舉例而言，抗CCR8 mAb或其抗原結合部分可特異性結合於腫瘤浸潤性Treg，但不結合於PBMC，例如，在固定的PBMC中不展示細胞質染色。舉例而

言，可藉由例如在固定的組織樣品上用相關Ab進行標準染色(例如，藉由實例14中描述之方法)來確定Ab不與上述清單中之細胞及組織結合。

【0120】

藉由抗CCR8 MAb抑制CCR8/配位體信號傳導

在實例15及16中，藉由對表現CCR8之CHO細胞株進行鈣(ca)通量分析法來測試抗CCR8 mAb對分別結合於hCCR8及mCCR8之hCCL1及mCCL1之阻斷以及CCR8/CCL1信號傳導之阻斷，因為CHO細胞上的CCR8之CCL1接合誘導Ca通量。CCL1為唯一的已知結合於CCR8之配位體。研究表明，結合於CCR8之CCL1可在活體外分析法中增強Treg抑制以及在小鼠模型中抑制自體免疫發炎反應(Barsheshet等人, 2017)。阻斷性抗CCR8 Ab在SA1N纖維肉瘤模型中亦顯示部分抗腫瘤功效(圖28A)。因此，在本發明之某些實施例中，本發明之抗CCR8 Ab或其抗原結合部分抑制CCL1與CCR8 (例如，hCCR8或mCCR8)之結合，且抑制CCR8/CCL1信號傳導。在較佳實施例中，分別如實例15及16中關於hCCR8及mCCR8所描述來量測Ca通量之抑制。

【0121】 在某些實施例中，抗hCCR8 mAb以約10 nM或更低；約5 nM或更低；較佳約1 nM或更低；更佳約0.5 nM或更低；更佳約0.1 nM或更低；甚至更佳約0.01 nM或更低之IC_{50}抑制CCR8/CCL1信號傳導。在某些較佳實施例中，抗hCCR8 mAb以約0.5 nM之IC_{50}抑制CCR8/CCL1信號傳導。在某些實施例中，抗hCCR8 Ab以約0.01 nM與約10 nM之間的IC_{50}抑制CCR8/CCL1信號傳導。在某些其他實施例中，抗hCCR8 Ab以約0.05 nM與約5 nM之間的IC_{50}抑制CCR8/CCL1信號傳導。在某些較佳實施例中，抗hCCR8 Ab以約0.1 nM與約1 nM之間的IC_{50}抑制CCR8/CCL1信號傳

導。在更佳實施例中，抗hCCR8 Ab以約0.2 nM與約0.5 nM之間的IC_{50}抑制CCR8/CCL1信號傳導。此等IC_{50}值係基於實例15中描述之分析法。

【0122】

由抗CCR8 MAb進行之ADCC介導之CCR8表現細胞之殺傷

藉由量測抗hCCR8及抗mCCR8 mAb誘導表現Fc受體之人類或小鼠報導細胞之交聯的能力來間接地評估其誘導ADCC介導之CCR8表現細胞之殺傷之能力。在某些實施例中，本發明之mAb或其抗原結合部分以某一EC_{50}介導CCR8表現細胞之消耗，如藉由CD16交聯分析法所量測。在較佳實施例中，藉由實例17及18中分別關於hCCR8及mCCR8所描述之交聯分析法來量測ADCC潛力。

【0123】 在某些實施例中，抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分以約100 pM或更低，較佳約30 pM或更低，較佳約10 pM或更低，較佳約3 pM或更低，更佳約1 pM或更低，更佳約0.5 pM或更低，更佳約0.1 pM或更低，或甚至更佳約0.05 pM或更低之EC_{50}介導CCR8表現細胞之消耗，如藉由CD16交聯分析法所量測。在某些較佳實施例中，抗hCCR8 mAb以約0.7 pM之EC_{50}介導CCR8表現細胞之消耗。在某些實施例中，抗hCCR8 Ab以約0.05 pM與約50 pM之間，較佳約0.1 pM與約10 nM之間，更佳約0.3 nM與約7 nM之間且甚至更佳約0.6 nM與約3 nM之間的EC_{50}介導CCR8表現細胞之消耗。此等EC_{50}值係基於實例17中描述之CD16交聯分析法。

【0124】 在實例19及20中證明經活化之Treg及患者腫瘤Treg之直接殺傷。在某些實施例中，抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分以約500 pM或更低，較佳約100 pM或更低，較佳約30 pM或更低，更佳約15 pM或更低，甚至更佳約5 pM或更低，或更佳約1 pM或更低之EC_{50}介導經活化之

Treg之消耗，如藉由細胞凋亡分析法所量測。在某些較佳實施例中，抗hCCR8 mAb以約13 pM之EC_{50}介導CCR8表現細胞之消耗。在某些實施例中，抗hCCR8 mAb以約1 pM與約500 pM之間，較佳約5 pM與約100 pM之間且更佳約10 pM與約50 pM之間的EC_{50}介導CCR8表現細胞之消耗。此等EC_{50}值係基於實例19中描述之細胞凋亡分析法。

【0125】

抗CCR8 mAb未引起CCR8之內化

對某些細胞表面受體具有特異性之Ab經由受體介導之內飲作用來誘導受體之內化，內化可能為用於治療性應用之某些藥物、毒素或酶之靶向遞送所必需的。如圖19中所示，抗可誘導型T細胞共刺激劑(ICOS)mAb在不存在交聯Ab之情況下不引起ICOS受體之內化，但在存在交聯Ab之情況下引起顯著的ICOS內化。相比之下，抗CCR8 mAb在存在或不存在交聯Ab之情況下皆不引起CCR8之內化。由於自Treg細胞表面移除受體，由抗CCR8 Ab引起之CCR8之內化將降低其介導Treg消耗之能力。因此，不存在由抗CCR8 Ab引起之CCR8內化進一步證實此等Ab之治療潛力。可藉由此項技術中使用之標準技術，例如實例21中之實驗方案來量測CCR8內化。

【0126】 因此，本發明提供抗CCR8 mAb或其抗原結合部分，其在存在或不存在交聯Ab之情況下，在結合於細胞表面上之CCR8時不引起CCR8之內化。在某些較佳實施例中，在細胞表面上表現CCR8之細胞為Treg。

【0127】

活體外及離體患者腫瘤樣品中之人類腫瘤Treg之消耗

在活體外系統中評估抗hCCR8 mAb介導腫瘤Treg之消耗之能力，其中將經消化之患者腫瘤與同種異體NK細胞共同培養(實例22)。證實抗hCCR8 mAb，即4A19，誘導腫瘤Treg之消耗而不減少Teff之群體。在此活體外分析法系統中，mAb 4A19在Treg消耗方面比抗CCR4-nf mAb更有效(圖20A)且不誘導$CD4^+$效應T細胞之消耗，而抗CCR4-nf Ab以可量測方式引起此等細胞之消耗(圖20B)。抗CCR8及抗CCR4皆不消耗$CD8^+$效應T細胞(圖20C)。

【0128】亦使用經切片之患者腫瘤在離體分析法系統中評估抗hCCR8 mAb誘導腫瘤Treg之消耗之能力(實例20)。證實mAb 16B13-IgG1-nf在不添加同種異體NK細胞之情況下介導Treg消耗(圖18H及18I)。

【0129】在某些實施例中，本發明之抗CCR8 mAb或其抗原結合部分活體外誘導腫瘤Treg之消耗而不減少$CD4^+$或$CD8^+$效應T細胞之群體。在較佳實施例中，使用實例22中描述之分析法量測活體外腫瘤Treg之消耗。

【0130】在某些其他實施例中，本發明之抗CCR8 mAb或其抗原結合部分誘導離體患者腫瘤組織樣品中之腫瘤Treg之消耗。在某些較佳實施例中，使用實例20中描述之分析法來量測離體患者腫瘤組織樣品中之腫瘤Treg之消耗。

【0131】

抗mCCR8特異性介導之腫瘤Treg之消耗，且不介導正常組織樣品中之CCR8 T細胞之消耗

除腫瘤Treg以外，CCR8亦在胸腺T細胞之小型子集以及皮膚駐留T細胞(其係在皮膚中發現之稀少群體)上表現。在呈現與人類極類似之

CCR8表現概況之CT26小鼠同基因型腫瘤模型中，抗mCCR8消耗性mAb，即抗CCR8-mIgG2a，選擇性地消耗腫瘤中之CCR8$^+$ Treg，但不消耗皮膚、胸腺、脾或血液中之CCR8$^+$ T細胞(實例24)。抗CCR8-mIgG2a在腫瘤但非其他表現CCR8之器官中之高特異性消耗活性可歸因於Ab結合之目標細胞附近的FcγRIV表現細胞之相對較低出現率或皮膚、胸腺、脾及血液中之CCR8$^+$ T細胞上之較低CCR8表面密度。此有力地支持以下觀點：對活化性FcγR具有最佳化親和力之抗CCR8 Ab (諸如人類或人類化IgG1-nf抗CCR8 mAb，如4A19或14S15)將實現人類患者中之強效腫瘤Treg消耗而不會無意地消耗CD16表現較低之皮膚中之CCR8$^+$ T細胞。

【0132】 在所揭示之本發明之某些實施例中，抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分特異性誘導腫瘤Treg之消耗而不消耗皮膚、胸腺、脾及血液中之CCR8$^+$ T細胞。在某些較佳實施例中，使用實例24中描述之分析法量測活體內腫瘤Treg之消耗。

【0133】

抗CCR8 MAb與參考Ab結合於相同CCR8抗原決定基

本發明亦提供經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其與參考Ab結合於hCCR8之相同抗原決定基，其中參考Ab包含：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:3所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:15所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(c) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:5所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:17所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(d) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(e) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:7所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:19所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(f) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:8所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:20所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(g) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:9所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:21所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(h) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:10所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:22所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(i) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:11所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:23所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(j) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:12所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:24所闡述之序列的連續連接之胺

基酸；

(k) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:13所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:25所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(l) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:14所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:26所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(m) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0134】 在某些較佳實施例中，提供經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其與參考Ab結合於hCCR8之相同抗原決定基，其中參考Ab包含：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:1144所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(c) VH，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及VL，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0135】 在某些較佳實施例中，提供經分離之Ab，較佳mAb，或其

抗原結合部分，其與參考Ab結合於hCCR8之相同抗原決定基，其中參考Ab包含V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0136】

與參考Ab交叉競爭結合於CCR8之抗CCR8 MAb

所揭示之本發明之範疇內亦涵蓋經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8且與參考Ab或其參考抗原結合部分交叉競爭結合於hCCR8。Ab對「交叉競爭」結合於抗原(例如，CCR8)之能力指示第一Ab與第二Ab結合於抗原之實質上相同的抗原決定基區域且在空間上阻礙第二Ab與該特定抗原決定基區域之結合，及相反地，第二Ab與第一Ab結合於抗原之實質上相同的抗原決定基區域且在空間上阻礙第一Ab與該抗原決定基區域之結合。因此，測試Ab競爭性抑制例如mAb 14S15或4A19與hCCR8之結合之能力表明測試Ab與mAb 14S15或4A19結合於hCCR8之實質上相同的抗原決定基區域。

【0137】 若第一Ab使第二Ab與抗原之結合減少達至少約40%，則認為第一Ab與第二Ab結合於「實質上相同的抗原決定基」。較佳地，第一Ab使第二Ab與抗原之結合減少超過約50% (例如，至少約60%或至少約70%)。在更佳實施例中，第一Ab使第二Ab與抗原之結合減少超過約70% (例如，至少約80%、至少約90%或約100%)。第一及第二Ab之順序可顛倒，亦即，「第二」Ab可首先結合於表面且「第一」Ab隨後在存在「第二」Ab之情況下與表面接觸。若在與Ab添加至固定抗原中之順序無關的情況下觀測到與抗原之結合之競爭性減少，則認為該等Ab「交叉競爭」。

【0138】 預期交叉競爭Ab具有與參考Ab之特性極類似的功能特性，因為其結合於抗原(諸如CCR8受體)之實質上相同的抗原決定基區域。交叉競爭之程度越高，功能特性之相似性將越高。舉例而言，若兩種交叉競爭性Ab各自抑制其中另一者與抗原決定基之結合達至少約80%，則預期其具有基本上相同的功能特性。若交叉競爭性Ab呈現類似的對抗原決定基之結合親和力(如藉由解離常數(K_D)所量測)，則預期此功能相似性將甚至更緊密。

【0139】 使用重組抗原分子或細胞表面表現之抗原分子，交叉競爭性抗抗原Ab可基於其在標準抗原結合分析法中之以可偵測方式競爭之能力而容易地鑑別，包括BIACORE®分析、ELISA分析法或流式細胞測量術。作為實例，簡單的用於鑑別測試Ab是否與mAb 4A19競爭結合於hCCR8之競爭分析法可涉及：(1)量測在飽和濃度下施用之4A19與上面固定有hCCR8之BIACORE®晶片(或其他適用於SPR分析之培養基)之結合，及(2)量測4A19與經hCCR8塗佈之BIACORE®晶片(或其他適合的培養基)之結合，該晶片先前已與測試Ab結合。比較在存在及不存在測試Ab之情況下，4A19與經hCCR8-1塗佈之表面之結合。在存在測試Ab之情況下4A19之結合之顯著(例如，超過約40%)減少指示兩種Ab識別實質上相同的抗原決定基，使得其競爭結合於hCCR8目標。第二Ab抑制第一Ab與抗原之結合之百分比可計算為：[1-(在存在第二Ab之情況下所偵測之第一Ab之結合)/(在不存在第二Ab之情況下所偵測之第一Ab之結合)]×100。為了測定Ab是否交叉競爭，除了量測在存在4A19之情況下測試Ab與經hCCR8塗佈之晶片之結合以外，重複競爭性結合分析法。

【0140】 本文中所揭示之任何抗CCR8 Ab皆可充當交叉競爭分析法

中之參考Ab。在某些實施例中，參考Ab包含：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:3所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:15所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(c) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:5所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:17所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(d) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(e) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:7所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:19所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(f) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:8所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:20所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(g) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:9所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:21所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(h) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:10所闡述之序列的連續連接之胺

基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:22所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(i) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:11所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:23所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(j) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:12所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:24所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(k) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:13所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:25所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(l) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:14所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:26所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(m) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0141】 在某些較佳實施例中，參考Ab包含：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:1144所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之

胺基酸；或

(c) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0142】在某些較佳實施例中，參考Ab包含V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0143】

結構上定義之抗CCR8 MAb

本發明亦提供經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8且包含以下中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:3所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:15所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(c) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:5所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:17所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(d) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基

酸；

(e) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:7所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:19所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(f) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:8所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:20所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(g) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:9所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:21所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(h) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:10所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:22所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(i) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:11所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:23所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(j) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:12所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:24所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(k) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:13所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:25所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(l) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:14所闡述之序列的連續連接之胺

基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:26所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(m) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0144】較佳為經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8且包含以下中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:1144所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(c) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0145】較佳為經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8且包含以下中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域：V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0146】已研發不同的用於劃定Ab內之CDR域之方法。Kabat及其

同事之方法(Wu及Kabat, 1970；Kabat等人, 1983)係基於以下假設：CDR包括Ab中之可變性最高之位置且因此可藉由比對極有限數目之可用的Ab序列來鑑別。基於此比對，Kabat等人引入用於高變區中之殘基之編號方案且確定標記各CDR之開端及末端之位置(http://bioinf.org.uk/abs/simkab.html)。

【0147】除廣泛使用之Kabat定義以外，已使用其他定義，包括Chothia (Chothia等人, 1987; 1989；Al-Lazikani等人, 1997; http://bioinf.org.uk/abs/chothia.html)、AbNum (Abhinandan及Martin, 2008；參見*AbNum*；可在http://www.bioinf.org.uk/abs/abnum/獲得)、AbM (http://www.bioinf.org.uk/abs；Martin等人, 1989)、接觸式(http://bioinf.org.uk/abs/；MacCallum等人, 1996)及IMGT (Lefranc等人, 2003；http://www.imgt.org)定義，其尋求解決Kabat定義之缺陷。儘管在未能獲得關於Ab之結構資訊時研發，但Kabat定義係最常用的用於預測CDR域之方法。

【0148】在未明確陳述時且除非上下文另有指示，否則使用Kabat定義鑑別本文中所揭示之CDR。使用Kabat方法定義之6個CDR域之胺基酸序列以及mAb 16B13、14S15、14S15h、18Y12、4A19、2M18、15C17、13T20、10R3、8D55、1V11、11K16及12F27之V_H、V_L、重鏈及輕鏈之胺基酸序列展示於表10中。

【0149】本發明提供經分離之Ab，較佳mAb，其包含如由Kabat方法定義之以下CDR域：

(a) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:27所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:28所闡

述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:29所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:30所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:31所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:32所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:33所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:34所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:35所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:36所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:37所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:38所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(c) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:39所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:40所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:41所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:42所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:43所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:44所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(d) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:45所闡述之序列的

連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:46所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:47所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:48所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:49所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:50所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(e) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:51所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:52所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:53所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:54所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:55所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:56所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(f) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:57所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:58所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:59所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:60所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:61所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:62所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(g) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:63所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:64所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:65所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:66所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:67所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:68所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(h) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:69所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:70所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:71所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:72所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:73所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:74所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(i) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:75所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:76所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:77所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:78所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:79所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:80所闡述之序列的連續連

接之胺基酸；

(j) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:81所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:82所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:83所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:84所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:85所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:86所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(k) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:87所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:88所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:89所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:90所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:91所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:92所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(l) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:93所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:94所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:95所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:96所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:97所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:98所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(m) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:103所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:104所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:105所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:106所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:107所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:108所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0150】 較佳經分離之Ab，較佳mAb，包含如由Kabat方法定義之以下CDR域：

(a) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:33所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:34所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:35所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:36所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:37所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:38所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:103所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:104所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如

SEQ ID NO:105所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:106所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:107所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:108所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(c) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:45所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:46所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:47所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:48所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:49所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:50所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0151】 在某些較佳實施例中，經分離之Ab，較佳mAb，包含如由Kabat方法定義之以下CDR域：重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:45所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:46所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:47所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:48所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:49所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:50所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0152】 所揭示之本發明亦涵蓋經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原

結合部分，其特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8，其中經分離之Ab或其抗原結合部分包含：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:3所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:15所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(c) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:5所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:17所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(d) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(e) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:7所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:19所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(f) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:8所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:20所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(g) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:9所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:21所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(h) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:10所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:22所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(i) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:11所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:23所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(j) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:12所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:24所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(k) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:13所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:25所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(l) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:14所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:26所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(m) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0153】 較佳經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8且包含：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(c) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0154】 較佳經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8且包含V_H，其包含如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0155】 包含具有與以上抗CCR8 Ab中之任一者之胺基酸序列高度類似或同源之胺基酸序列的V_H及V_L區域且保留此等Ab之功能特性之抗CCR8 Ab亦適用於本發明之方法。舉例而言，適合的Ab包括mAb，其包含有各自包含連續連接之胺基酸之V_H及/或V_L區域，該等連續連接之胺基酸具有分別與SEQ ID NO.6及/或18中所闡述之胺基酸序列至少80%一致之序列。舉例而言，在其他實施例中，V_H及/或V_L胺基酸序列分別與SEQ ID NO.6及/或18中所闡述之序列呈現至少85%、90%、95%或99%一致性。如本文中所使用，兩個胺基酸序列之間的序列一致性百分比為由序列共有之一致位置之數目與所比較之序列之長度之函數(亦即，一致性百分比=一致位置之數目/所比較之位置之總數×100)，考慮所引入之用於最大化兩個序列之間的序列一致性程度之任何空位之數目及每個此類空位之長度。可使用一般熟習此項技術者熟知的數學演算法實現序列之比較及兩個序列之間的一致性百分比之測定。

【0156】 當揭示包含具有與以上抗CCR8 Ab中之任一者之胺基酸序列高度類似或同源的胺基酸序列之V_H及V_L區域且保留此等Ab之功能特性之抗CCR8 Ab時，其可在至少1、2、3、4、5或全部6個CDR內具有100%一致性且與相關完全V_H及/或V_L序列具有至少85%、90%、95%或99%一致性。

【0157】 舉例而言，特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8的經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分可包含：

(a) V_H，其包含具有與如SEQ ID NO:4所闡述之序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列之連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有與如SEQ ID NO:16所闡述之序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列之連續連接之胺基酸，視情況其中V_H包含如關於SEQ ID NO:4所定義之CDR中之至少1、2或全部3者(SEQ ID NO 33-35)且V_L包含如關於SEQ ID NO:16所定義之CDR中之至少1、2或全部3者(SEQ ID NO 36-38)；

(b) V_H，其包含具有與如SEQ ID NO:115所闡述之序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列之連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有與如SEQ ID NO:116所闡述之序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列之連續連接之胺基酸，視情況其中V_H包含如關於SEQ ID NO:115所定義之CDR中之至少1、2或全部3者(SEQ ID NO.103-105)且V_L包含如關於SEQ ID NO:116所定義之CDR中之至少1、2或全部3者(SEQ ID NO.106-108)；或

(c) V_H，其包含具有與如SEQ ID NO:6所闡述之序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列之連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有與如SEQ ID NO:18所闡述之序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列之

連續連接之胺基酸，視情況其中V_H包含如關於SEQ ID NO:6所定義之CDR中之至少1、2或全部3者(SEQ ID NO.45-47)且V_L包含如關於SEQ ID NO:18所定義之CDR中之至少1、2或全部3者(SEQ ID NO.48-50)。

【0158】 類似地，對於本文中提及之其他經分離之Ab中之任一者，Ab可包含V_H，其包含具有與參考V_H序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列之連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有與參考V_H序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列之連續連接之胺基酸，視情況其中V_H包含如關於參考V_H序列所定義之CDR中之至少1、2或全部3者且V_L包含如關於參考V_L序列所定義之CDR中之至少1、2或全部3者。

【0159】 本發明亦涵蓋經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其視情況特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8，其中經分離之Ab或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:99所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:111所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:100所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:112所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(c) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:101所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:113所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(d) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接

之胺基酸；

(e) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:117所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:118所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(f) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:110所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:119所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0160】 較佳為經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其視情況特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8，其中經分離之Ab或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:100所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:112所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:117所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:118所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(c) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

較佳為經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其視情況特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8，其中經分離之Ab或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之

胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【0161】 在某些實施例中，本發明之經分離之抗CCR8 Ab或其抗原結合部分為人類Ab或其片段。在其他實施例中，其為人類化Ab或其片段。在其他實施例中，其為嵌合Ab或其片段。在其他實施例中，經分離之抗CCR8 Ab或其抗原結合部分為小鼠Ab或其片段。對於人類個體之投藥，Ab較佳為嵌合Ab或更佳為人類化或人類Ab。此類嵌合、人類化、人類或小鼠mAb可藉由此項技術中熟知之方法製備及分離。

【0162】 除全長Ab以外，本文中所揭示之抗CCR8 Ab亦包括能夠介導ADCC之抗原結合片段。

【0163】

抗CCR8免疫結合物

在另一態樣中，本發明係關於連接至細胞溶解劑(諸如細胞毒素或放射性同位素)的本文中所揭示之經分離之抗hCCR8 Ab中之任一者或其抗原結合部分。此類結合物在本文中稱為「免疫結合物」。使用在此項技術中可用的連接子技術使細胞毒素與本發明之Ab結合。此項技術中已建立用於製備放射免疫結合物之方法。

【0164】

雙特異性分子

在另一態樣中，本發明係關於雙特異性分子，其包含連接至結合域之本文中所揭示之經分離之抗hCCR8 mAb中之任一者或其抗原結合部分，該結合域具有與抗hCCR8 mAb或其抗原結合部分不同的結合特異性。結合域可為功能性分子，例如，另一種Ab、Ab之抗原結合部分或受

體之配位體，使得所產生之雙特異性分子結合於至少兩個不同的結合位點或目標分子。

【0165】

編碼抗hCCR8 MAb之核酸及用於表現Ab之用途

本發明之另一態樣係關於編碼本發明之經分離之抗hCCR8 Ab中之任一者之核酸。本發明提供編碼本文中所描述之抗CCR8 mAb中之任一者或其抗原結合部分之經分離之核酸。

【0166】「經分離之」核酸係指物質之核酸組合物，其與天然存在之核酸明顯不同，亦即，具有獨特的化學一致性、性質及效用。舉例而言，與原生DNA不同，經分離之DNA為原生DNA之獨立部分且不為在自然界中發現之較大的結構性複合物(染色體)之整體部分。此外，與原生DNA不同，經分離之DNA可用作PCR引子或雜交探針，以尤其用於量測基因表現及偵測生物標記物基因或突變，以用於診斷疾病或預測治療劑之功效。亦可使用此項技術中熟知的標準技術純化經分離之核酸，以實質上不含其他細胞組分或其他污染物，例如其他細胞核酸或蛋白質。

【0167】本發明之核酸可使用標準分子生物學技術獲得。對於由融合瘤(例如，由攜帶人類Ig基因之轉基因小鼠製備之融合瘤，如實例8中所描述)表現之Ab，可藉由標準PCR擴增技術獲得編碼由融合瘤產生之Ab之輕鏈及重鏈或可變區之cDNA。在獲得編碼V_H及V_L區段之DNA片段後，此等DNA片段可使用標準重組DNA技術進一步操作，例如以將可變區DNA轉化成全長Ab鏈基因、Fab片段基因或scFv基因。對於由Ig基因庫獲得之Ab (例如，使用噬菌體呈現技術)，可自該庫回收編碼Ab之核酸。

【0168】本發明之核酸可為例如RNA或DNA，諸如cDNA或基因體

DNA。在較佳實施例中，核酸為cDNA。

【0169】 本發明亦提供包含經分離之核酸之表現載體，該經分離之核酸編碼抗CCR8 mAb或其抗原結合部分。本發明進一步提供包含該表現載體之宿主細胞。較佳真核細胞且最佳哺乳動物宿主細胞作為用於表現Ab之宿主細胞，因為此類真核細胞且特定言之，哺乳動物細胞，比原核細胞更有可能組裝及分泌適當摺疊且免疫活性Ab。用於表現本發明之重組Ab之較佳哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary；CHO)細胞(Kaufman及Sharp, 1982)、NSO骨髓瘤細胞、COS細胞及SP2細胞。

【0170】 宿主細胞可用於製備抗CCR8 mAb或其抗原結合部分之方法中，該方法包含在宿主細胞中表現mAb或其抗原結合部分及自宿主細胞分離mAb或其抗原結合部分。宿主細胞可離體或活體內使用。可將編碼Ab重鏈及輕鏈之DNA插入單獨的表現載體中或更典型地，皆插入同一載體中。藉由將編碼Ab之V_H及V_L區段之DNA插入已編碼所需同型之重鏈及輕鏈恆定區之表現載體，使得V_H區段以可操作的方式連接至載體內之C_H區段且V_K區段以可操作的方式連接至載體內之C_L區段，可使用此等可變區建立任何同型之全長Ab。不具有α-(1,6)岩藻醣基轉移酶(FUT8)酶之細胞株可用於產生在碳水化合物中不具有岩藻醣之mAb (參見例如，美國公開案第2004/0110704號；Yamane-Ohnuki等人, 2004；EP 1176195)。

【0171】 本發明之另一態樣係關於包含人類Ig重鏈及輕鏈轉基因之轉基因小鼠，其中小鼠表現本文中所揭示之抗CCR8 HuMAb中之任一者。本發明亦涵蓋由該小鼠製備之融合瘤，其中該融合瘤產生HuMAb。

【0172】

治療性抗CCR8方法

因為在本發明之研究中產生之抗hCCR8 Ab不結合於mCCR8，使用小鼠抗mCCR8 mAb作為人類或人類化nf IgG1抗hCCR8 mAb之替代物以測試抗CCR8作為抗癌藥在小鼠腫瘤模型中之功效。適當Ab同型之選擇可用於增強小鼠中之CCR8介導之藉由ADCC/ADCP進行之腫瘤Treg消耗，已證明此消耗主要由Ab與鼠類腫瘤中富含之FcγRIV^{+}細胞(Nimmerjahn等人, 2010)之相互作用驅動(Simpson等人, 2013)。使用具有小鼠IgG2a同型之抗mCCR8 mAb (稱為抗CCR8-mIgG2a)作為將可能用作人類治療劑之人類化或人類抗hCCR8 mAb之替代物。抗CCR8-mIgG2a係來源於由BioLegend以純系SA214G2出售之市售大鼠抗mCCR8 mAb，其經修飾以將大鼠IgG2b同型變為小鼠IgG2a同型。與人類抗hCCR8 mAb，即A419及14S15類似，抗CCR8-mIgG2a為N端結合物且其mIgG2a主鏈提供最大FcγR結合，以用於驅動與人類nf格式類似之ADCC反應。

【0173】 證明抗CCR8-mIgG2a具有與所測試之若干抗hCCR8 mAb之高ADCC潛力(實例17)類似的高ADCC潛力(實例18)，且阻斷mCCL1與mCCR8表現細胞之結合(實例16)，但其效能低於所測試之若干抗hCCR8 mAb阻斷hCCL1與hCCR8表現細胞之結合(實例15)。抗hCCR8 mAb亦呈現強效ADCC活性(實例19及20)。與某些所揭示之抗hCCR8 mAb相比，抗CCR8-mIgG2a亦以較低親和力結合於mCCR8表現細胞(實例13)。此表明在指導關於小鼠模型中之腫瘤生長的抑制之研究方面，抗CCR8-mIgG2a為抗hCCR8 mAb之適合的替代物，但抗hCCR8 Ab可能由於其對其同源hCCR8目標之較高結合親和力、在阻斷CCL1配位體與CCR8之結合方面之較高活性及較高ADCC潛力而更強效地抑制人類個體中之腫瘤生

長。

【0174】使用各種同基因型小鼠腫瘤模型測定抗CCR8-mIgG2a小鼠替代物(即單獨的mAb及與抗PD-1之組合)之抗腫瘤活性。抗CCR8-mIgG2a mAb (在免疫原性小鼠腫瘤模型中以單一試劑形式，包括CT26及MC38結腸腺癌模型及SA1N纖維肉瘤模型，參見實例2326及29，且在免疫療法抗性模型MB49及4T1中以與抗PD-1之組合形式)介導之Treg消耗及連續促炎性反應(CD8、CD4、干擾素-γ、顆粒酶B及Ki67之增加)誘導穩定的腫瘤生長抑制及高百分比之完成腫瘤清除。相比之下，用CCR8-mIgG1-D265A，一種包含Fc惰性mIgG1-D265A重鏈之變異型Ab (Baudino等人, 2008)，進行之治療對腫瘤消退之作用最小(實例29及30)。為了測定在抗CCR8 Ab治療後，Treg消耗與腫瘤功效之間是否存在劑量依賴性關係，在MC38模型中進行單次劑量單藥療法研究且觀測到劑量依賴性藥物動力學/藥效學/功效關係(實例26)。此外，在消耗時觀測到腫瘤上清液中之增加及可滴定之CCL1配位體變化(資料未展示)，其可充當替代性生物標記物。

【0175】在MB49小鼠膀胱癌中，抗CCR8-mIgG2a僅展示部分抗腫瘤活性，但仍比抗PD-1 mAb之活性強(實例27)。類似地，在4T1小鼠乳癌模型中，抗CCR8-mIgG2a亦僅展示部分抗腫瘤活性，但此腫瘤對用抗PD-1 mAb進行之治療具有完全抗性(實例28)。在兩種腫瘤模型中，抗CCR8-mIgG2a增強由抗PD-1誘導之免疫反應，引起抗腫瘤反應之效能之顯著增加。兩種Ab之組合以協同方式強效抑制此等頑固性腫瘤模型中之腫瘤生長。在本文中，若Ab之組合之抗腫瘤功效大於由各Ab個別地呈現之抗腫瘤功效之總和，則認為此等Ab以協同方式相互作用。

【0176】 在用14S15、16B13及4A19 mAb進行治療時，亦在人類腫瘤外植體模型中證明腫瘤Treg特異性消耗(實例20)。

【0177】

以單藥療法形式使用抗CCR8 mAb來治療癌症

本文中所提供之資料說明抗hCCR8 mAb之產生，該抗hCCR8 mAb以高親和力(EC_{50}=約0.1-2 nM；實例11)結合於經活化之Treg之表面上之hCCR8、在原發性經活化之人類Treg與同種異體活化NK細胞共同培養之活體外系統中誘導經由ADCC進行之Treg之強效殺傷(EC_{50}=約10-60 pM；實例19)且在人類腫瘤外植體及小鼠模型中介導$CCR8^+$腫瘤浸潤性Treg之特異性消耗(實例20、22及24)。此等mAb在多種免疫原性及免疫療法抗性小鼠腫瘤模型中呈現穩定的腫瘤生長抑制(實例23、25、27-29)，且資料強力支持CCR8消耗(以單藥療法或與免疫檢查點阻斷之組合形式)作為用於癌症之新穎免疫療法之臨床評估。

【0178】 因此，如由實例中提供之資料支持，本發明提供一種用於治療罹患癌症之個體之方法，其包含向個體投與治療有效量之Treg消耗性抗CCR8 Ab (例如，本文中所揭示之mAb、免疫結合物或雙特異性分子)中之任一者或包含該等Ab (例如，抗CCR8 mAb、免疫結合物或雙特異性分子)中之任一者之醫藥組合物，使得該個體得到治療。

【0179】 本發明亦提供一種用於抑制個體中之腫瘤細胞之生長之方法，其包含向個體投與治療有效量之Treg消耗性抗CCR8 Ab(例如，本文中所揭示之mAb、免疫結合物或雙特異性分子)中之任一者，或包含該等抗CCR8 Ab (例如，mAb、免疫結合物或雙特異性分子)中之任一者之醫藥組合物，使得抑制個體中之腫瘤細胞之生長。

【0180】

用抗CCR8 Ab與另一種抗癌劑之組合治療癌症

本發明提供一種用於治療罹患癌症之個體之方法，其包含向個體投與治療有效量之：(a)本文中所揭示之Treg消耗性抗CCR8 Ab、免疫結合物或雙特異性分子中之任一者，或包含該等抗CCR8 Ab、免疫結合物或雙特異性分子中之任一者之醫藥組合物；及(b)其他用於治療癌症之治療劑，視情況其中該其他治療劑為降低免疫系統之抑制或增加免疫系統之刺激之化合物，使得個體得到治療。

【0181】 本發明亦提供一種用於抑制個體中之腫瘤細胞之生長之方法，其包含向個體投與治療有效量之：(a)本文中所揭示之Treg消耗性抗CCR8 Ab、免疫結合物或雙特異性分子中之任一者，或包含該等抗CCR8 Ab、免疫結合物或雙特異性分子中之任一者之醫藥組合物；及(b)其他用於治療癌症之治療劑。在某些較佳實施例中，其他治療劑為降低免疫系統之抑制或增加免疫系統之刺激之化合物，使得抑制個體中之腫瘤細胞之生長。

【0182】 在本發明之方法中之任一者之其他較佳實施例中，個體為人類患者。

【0183】 Treg介導之免疫抑制可能係免疫腫瘤學中之最佳抗腫瘤免疫反應之主要障礙。由癌症免疫療法靶向之許多分子(諸如PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3及TIGIT)在Treg上被上調(Kumar等人, 2018)。因此，此等基於T細胞之免疫療法亦具有增強Treg反應之可能性。舉例而言，PD-1阻斷可增強Treg抑制及增加Treg增殖(Kamada等人, 2019)，且存在臨床上在抗CTLA-4療法之後發生Treg擴增之證據(Kavanagh等人, 2008)。因

此，Treg消耗性藥劑不僅以單藥療法形式改良抗腫瘤反應，且亦增強如本文中所揭示之其他免疫療法之活性(參見實例27及28)。因此，本發明提供一種用於增強罹患癌症之個體中的由治療劑引發之抗腫瘤免疫反應之方法，其中治療劑為免疫治療劑，諸如癌症免疫療法，諸如特異性結合於PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3或TIGIT之抗體。

【0184】 在小鼠腫瘤模型中，在用抗CCR8-mIgG2a及抗PD-1處理之小鼠中觀測到強效組合性抗腫瘤活性(實例27及28)。儘管在抗CCR8單藥療法及組合治療之情況下存在$CD8^+$ T細胞出現率之類似增加，可能仍需要抗PD-1以增強效應子功能性。此外，已證明抗CCR8治療引起長期的抗原特異性$CD8^+$ T細胞記憶(實例31)。此等結果對於治療晚期癌症具有重要的臨床意義，該等晚期癌症通常對抗PD1/PD-L1療法具有抗性(Jenkins等人, 2018)且具有高復發率(Mahvi等人, 2018)。總體而言，此等研究強調腫瘤Treg上之CCR8之特異性及可靶向性，且支持在晚期實體腫瘤之治療中評估呈單藥療法或與另一種免疫療法(諸如抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4)之組合形式之抗CCR8消耗性Ab。

【0185】 在所揭示之方法之某些實施例中，其他治療劑為降低免疫系統之抑制之化合物。舉例而言，其他治療劑可為小分子化合物、巨環肽、融合蛋白或Ab，例如mAb。在其他實施例中，其他治療劑為拮抗劑，諸如拮抗性mAb，其特異性結合於計劃性死亡-1 (PD-1)、計劃性死亡配位體-1 (PD-L1)、細胞毒性T淋巴細胞抗原-4 (CTLA-4)、淋巴細胞活化基因-3 (LAG-3)、B及T淋巴細胞弱化子(BTLA)、T細胞免疫球蛋白及黏蛋白域-3 (TIM-3)、殺手免疫球蛋白樣受體(KIR)、殺手細胞凝集素樣受體G1 (KLRG-1)、腺苷A2A受體(A2aR)、具有Ig及ITIM域之T細胞免疫

受體(TIGIT)、T細胞活化之V域Ig抑制因子(VISTA)、原癌基因酪胺酸-蛋白質激酶MER (MerTK)、自然殺手細胞受體2B4 (CD244)或CD160。

【0186】 在某些較佳實施例中，其他治療劑為特異性結合於PD-1之拮抗性Ab或其抗原結合部分。在其他實施例中，特異性結合於PD-1之Ab係選自尼沃單抗(nivolumab)、派立珠單抗(pembrolizumab)、測米匹單抗(cemiplimab)、斯巴達珠單抗(spartalizumab)、卡瑞利珠單抗(camrelizumab)、斯迪利單抗(sintilimab)、緹勒珠單抗(tislelizumab)、特瑞普利單抗(toripalimab)、多斯利單抗(dostarlimab)、瑞弗利單抗(retifanlimab)及皮米單抗(pimivalimab)，例如選自尼沃單抗、派立珠單抗、測米匹單抗、斯巴達珠單抗、卡瑞利珠單抗、斯迪利單抗、緹勒珠單抗及例如特瑞普利單抗，例如選自尼沃單抗及派立珠單抗。

【0187】 在其他較佳實施例中，其他治療劑為特異性結合於PD-L1之拮抗性Ab或其抗原結合部分。在其他實施例中，特異性結合於PD-L1之Ab係選自阿特珠單抗(atezolizumab)、德瓦魯單抗(durvalumab)、艾維路單抗(avelumab)、恩沃利單抗(envafolimab)、BMS-936559、CK-301、CS-1001、SHR-1316、CBT- 502、BGB-A333及KN035，例如選自阿特珠單抗、德瓦魯單抗、艾維路單抗、恩沃利單抗、BMS-936559、CK-301、CS-1001、SHR-1316、CBT-502、BGB-A333，例如選自阿特珠單抗、德瓦魯單抗及艾維路單抗。

【0188】 在其他較佳實施例中，其他治療劑為特異性結合於CTLA-4之拮抗性Ab或其抗原結合部分。在其他實施例中，特異性結合於CTLA-4之Ab為伊派利單抗(ipilimumab)或曲美木單抗(tremelimumab)，例如選自伊派利單抗。

【0189】 本發明亦提供一種用於增強罹患癌症之個體中的由治療劑引發之抗腫瘤免疫反應之方法，其包含向個體投與治療有效量之本文中所揭示之Treg消耗性抗CCR8 Ab、免疫結合物或雙特異性分子中之任一者，或包含該等抗CCR8 Ab、免疫結合物或雙特異性分子中之任一者之醫藥組合物，使得個體經歷比由單獨的治療劑引發之免疫反應更強的針對癌症之免疫反應。在此方法之某些較佳實施例中，治療劑為檢查點抑制劑，例如抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 mAb。在此方法之某些較佳實施例中，治療劑為抗PD-1 Ab尼沃單抗。在其他較佳實施例中，治療劑為抗PD-1 Ab派立珠單抗。在某些較佳實施例中，治療劑為抗PD-L1 Ab阿特珠單抗。在其他較佳實施例中，治療劑為抗PD-L1 Ab德瓦魯單抗。在其他較佳實施例中，治療劑為抗PD-L1 Ab艾維路單抗。在此方法之某些較佳實施例中，治療劑為抗CTLA-4 Ab伊派利單抗。在某些其他實施例中，治療劑為放射線療法。

【0190】

可由所揭示之方法治療之癌症

依賴於使用免疫系統之幾乎無限制的靈活性來攻擊及破壞癌細胞之免疫腫瘤學適用於治療極廣泛範圍之癌症(參見例如Yao等人, 2013；Callahan等人, 2016；Pianko等人, 2017；Farkona等人, 2016；Kamta等人, 2017)。舉例而言，已證實抗PD-1 Ab，尼沃單抗，可有效治療多種不同類型之癌症(參見例如Brahmer等人, 2015；Guo等人, 2017；Pianko等人, 2017；WO 2013/173223)且當前正在進行多種實體及血液癌症中之臨床試驗。因此，所揭示之方法(其以單藥療法或與另一種免疫療法(諸如免疫檢查點抑制)之組合形式使用CCR8介導之腫瘤浸潤性Treg之消耗)適用

於治療多種實體及液體腫瘤。

【0191】

適於治療之癌症之廣效性

因為本文中所揭示之癌症治療方法中所使用之Ab不直接靶向癌細胞，而改為藉由消耗免疫抑制性Treg來靶向及增強免疫系統(視情況與免疫檢查點抑制組合，其促進免疫系統攻擊及破壞癌細胞)，所以此等Ab適用於治療廣泛範圍之癌症。已說明尼沃單抗在治療不同癌症中之功效，由批准此藥物用於治療晚期黑素瘤、晚期非小細胞肺癌、轉移性腎細胞癌、經典霍奇金氏淋巴瘤(classical Hodgkin lymphoma)、頭部及頸部之晚期鱗狀細胞癌、轉移性尿道上皮癌、MSI-H或dMMR轉移性大腸直腸癌、肝細胞癌瘤、小細胞肺癌及食道鱗狀細胞癌(Drugs.com - Opdivo Approval History: https://www.drugs.com/history/opdivo.html)以及正在進行的許多其他癌症中之臨床試驗證明。類似地，抗PD-L1藥物(諸如阿特珠單抗(TECENTRIQ®)、德瓦魯單抗(IMFINZI®)及艾維路單抗(BAVENCIO®)已在多種適應症中獲得批准。因此，可使用抗CCR8 Ab (及視情況地，與抗CCR8及抗PD-1/PD-L1 Ab之組合)治療多種不同癌症。此治療劑之組合顯示之高功效使得能夠集中於具有大量未滿足的醫療需求之癌症。

【0192】 在某些實施例中，所揭示之癌症療法方法可廣泛地用於治療實體腫瘤型癌症。舉例而言，在某些實施例中，實體腫瘤為選自以下之癌症：鱗狀細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)、鱗狀NSCLC、非鱗狀NSCLC、頭頸癌、乳癌、食道癌、胃癌、胃腸癌、小腸癌、肝癌、肝細胞癌瘤(HCC)、胰臟癌(PAC)、腎癌、腎細胞癌(RCC)、膀胱癌、尿道癌、輸尿管癌、大腸直腸癌(CRC)、結腸癌、結腸癌瘤、肛

門區癌、子宮內膜癌、前列腺癌、纖維肉瘤、神經母細胞瘤、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、生殖細胞腫瘤、兒童肉瘤、鼻腔鼻竇自然殺手細胞、黑素瘤、皮膚癌、骨癌、子宮頸癌、子宮癌、子宮內膜癌、輸卵管癌、卵巢癌、子宮頸癌瘤、陰道癌、外陰癌、睪丸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、陰莖癌、腎盂癌瘤、中樞神經系統(CNS)之贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、腫瘤血管生成、脊椎軸腫瘤、腦癌、腦幹神經膠質瘤、垂體腺瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮樣癌症、鱗狀細胞癌症、兒童實體腫瘤、環境誘導之癌症、病毒相關癌症、病毒性來源癌症、晚期癌症、不可切除性癌症、轉移性癌症、難治性癌症、復發性癌症及其任何組合。在某些實施例中，癌症為晚期、不可切除性、轉移性、難治性癌症及/或復發性癌症。

【0193】 基於小鼠模型中之用抗CCR8有效治療不同癌症之論證(實例23-29)，預期某些腫瘤類型尤其適於用抗CCR8 Ab治療。因此，在某些實施例中，實體腫瘤為選自結腸腺癌、膀胱癌、乳癌及纖維肉瘤之癌症。抗CCR8在抗PD-1展示極小功效之小鼠模型(諸如MB49膀胱(實例27)及4T1乳癌模型(實例28))中有效地使腫瘤縮小之結果表明抗CCR8可極廣泛地適用於且比抗PD-1更廣泛地有效用於治療癌症，且抗CCR8與檢查點阻斷劑(例如，抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4)之組合甚至可具有更廣泛的用於治療不同癌症之適用性。

【0194】 對人類腫瘤進行單細胞RNA-seq分析以進行$CCR8^+$ Treg之差異性基因表現分析(實例32)。CCR8及CD8A之相對高表現以及其高CCR8/CD8A比率將頭頸部鱗狀細胞癌(HNSC)、肺腺癌(LUAD)、胃腺癌(STAD)、肺鱗狀細胞癌(LUSC)、胰臟腺癌(PAAD)、直腸腺癌(READ)、

食道癌(ESCA)、乳房侵襲性癌(BRCA)、結腸腺癌(COAD)以及子宮頸鱗狀細胞癌及子宮頸內腺癌(CESC)鑑別為預期尤其適於用抗CCR8 Ab治療之腫瘤類型。因此，在某些實施例中，實體腫瘤為選自HNSC、LUAD、STAD、LUSC、PAAD、READ、ESCA、BRCA、COAD、CESC、濾泡性淋巴瘤、急性淋巴細胞性白血病及淋巴瘤之癌症，如預期尤其適於用抗CCR8 Ab治療之腫瘤類型。

【0195】在17種腫瘤類型或亞型中藉由福爾馬林固定、石蠟包埋(FFPE)組織樣品上之IHC評估，發現CCR8表現在頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC；在本文中也稱為頭部及頸部之鱗狀細胞癌[SCCHN])中大量存在且在多形性神經膠母細胞瘤(GBM；實例33)中最少。基於表現大量CCR8之腫瘤更可能對用抗CCR8 Ab進行之治療起反應，此等腫瘤分析資料支持HNSCC、子宮頸、CRC、非小細胞肺癌-鱗狀細胞癌(NSCLC-SCC)、NSCLC-腺癌(NSCLC-ADC)、胰臟、胃、膀胱及乳癌對抗CCR8療法之優先權。因此，在某些實施例中，實體腫瘤為選自HNSCC、子宮頸、CRC、NSCLC-SCC、NSCLC-ADC、胰臟、胃、膀胱及乳癌之癌症。

【0196】在某些實施例中，本發明之療法方法可用於治療惡性血液病型癌症。血液惡性病包括來源於兩種主要血球譜系(亦即，骨髓細胞株(其產生粒細胞、紅血球、凝血細胞、巨噬細胞及肥大細胞)或淋巴細胞株(其產生B、T、NK及細胞))中之任一者之液體腫瘤，包括所有類型之白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。可使用本發明之療法方法治療之血液惡性病包括例如選自以下之癌症：急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇

金氏淋巴瘤(HL)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、多發性骨髓瘤、鬱積型骨髓瘤、意義不明單株伽瑪球蛋白症(MGUS)、晚期、轉移性、難治性及/或復發性血液惡性病以及該等血液惡性病之任何組合。

【0197】TARGET (用於產生有效治療之治療學適用性研究(Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments), https://ocg.cancer.gov/programs/target)分析亦表明，在所檢驗之血液惡性病中，發現濾泡性淋巴瘤、急性淋巴細胞性白血病及淋巴瘤具有最高的*CCR8*之相關表現且應優先用抗CCR8 mAb治療(實例32)。因此，在本發明之治療方法之某些實施例中，惡性血液病為濾泡性淋巴瘤或急性淋巴細胞性白血病及淋巴瘤。

【0198】在某些其他實施例中，惡性血液病為選自以下之癌症：急性、慢性、淋巴細胞性(淋巴母細胞性)及/或骨髓性白血病，諸如ALL、AML、CLL及CML；淋巴瘤，諸如HL、NHL，其中約85%為B細胞淋巴瘤，包括彌漫性大型B細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡性淋巴瘤(FL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)/小淋巴細胞性淋巴瘤(SLL)、套細胞淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤(黏膜相關淋巴組織(MALT)淋巴瘤、結邊緣區B細胞淋巴瘤及脾邊緣區B細胞淋巴瘤)、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)、淋巴漿細胞樣淋巴瘤(LPL；亦稱為瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia；WM))、毛狀細胞淋巴瘤及原發性中樞神經系統(CNS)淋巴瘤，T細胞淋巴瘤型NHL，包括前體T淋巴母細胞淋巴瘤/白血病、T-淋巴母細胞淋巴瘤/白血病(T-Lbly/T-ALL)、周邊T細胞淋巴瘤(諸如皮膚T細胞淋巴瘤(CTLC，亦即，蕈樣黴菌病、塞紮里症候群(Sezary症候群)等))、成年人T細胞淋巴瘤/白血病、血管免疫母細胞T細胞淋巴瘤、

結外自然殺手細胞/鼻型T細胞淋巴瘤、腸病相關腸道T細胞淋巴瘤(EATL)、多形性大細胞淋巴瘤(ALCL)及未指定之周邊T細胞淋巴瘤、急性骨髓淋巴瘤、淋巴漿細胞樣淋巴瘤、單核細胞樣B細胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、腸道T細胞淋巴瘤、原發性縱隔B細胞淋巴瘤、移植術後淋巴增生性病症、真實組織細胞淋巴瘤、原發性滲出性淋巴瘤、彌漫性組織細胞淋巴瘤(DHL)、免疫母細胞性大細胞淋巴瘤及前體B淋巴母細胞淋巴瘤；骨髓瘤，諸如多發性骨髓瘤、鬱積型骨髓瘤(亦稱為頑固性骨髓瘤)、意義不明單株伽瑪球蛋白症(MGUS)、孤立性漿細胞瘤、IgG骨髓瘤、輕鏈骨髓瘤、非分泌型骨髓瘤及澱粉樣變性；及該等血液惡性病之任何組合。

【0199】 在其他實施例中，惡性血液病係選自急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、T細胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤(HL)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、多發性骨髓瘤、鬱積型骨髓瘤、意義不明單株伽瑪球蛋白症(MGUS)、晚期、轉移性、頑抗性及/或復發性血液惡性病以及該等血液惡性病之任何組合。

【0200】 本發明之方法亦適用於治療晚期、轉移性、頑抗性及/或復發性血液惡性病。

【0201】 對於抗CCR8在治療癌症中之臨床試驗(實例34)，基於上述不同臨床前研究之結果來選擇某些實體腫瘤：在小鼠腫瘤模型中顯示抗CCR8之功效(實例23-29)；癌症基因體圖譜(國家癌症研究所, 2021)中表示之33種腫瘤類型中的CCR8及CD8A之RNA表現、鑑別具有CCR8之相對高表現及富含CD8A表現之腫瘤類型(實例32)；及如藉由IHC所量測之

17種腫瘤類型或亞型中之CCR8表現量(實例33)。所選擇的腫瘤類型為NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/胃食道(GE)接合區腺癌及子宮頸癌(鱗狀細胞癌[SCC]或腺癌)。儘管可獲得的晚期腫瘤之資料有限，但此選擇係由高CCR8表現量或Treg之存在與NSCLC、CRC、胃及子宮頸癌症中之較差預後相關聯支持(Shah等人, 2011；Yi等人, 2018；Zhao等人, 2016；Tao等人, 2012；Xu等人, 2020)。關於SCCHN之預後之報導具有混合性，可能部分由於用於偵測Treg之存在之不同方法及分子標記物(Saleh等人, 2020)。因此，在所揭示之用於治療癌症之方法之某些實施例中，實體腫瘤為選自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合區癌症及子宮頸癌之癌症。在某些較佳實施例中，實體腫瘤為NSCLC。在其他較佳實施例中，實體腫瘤為SCCHN。在其他較佳實施例中，實體腫瘤為MSS-CRC。在其他較佳實施例中，實體腫瘤為胃/GE接合區癌症。在其他較佳實施例中，實體腫瘤為子宮頸癌。

【0202】

抗CCR8及抗PD-1/抗PD-L1 Ab之醫學用途

本發明亦提供經分離之抗CCR8 Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其係用於治療罹患癌症之個體之方法中。本發明亦提供經分離之抗CCR8 Ab，較佳mAb或其抗原結合部分，及檢查點抑制劑，諸如經分離之抗PD-1/抗PD-L1 Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其係組合用於治療罹患癌症之個體之方法中，該方法包含雙重Treg消耗及檢查點路徑(例如，PD-1/PD-L1信號傳導路徑)之阻斷。抗CCR8 Ab可以單藥療法或與檢查點抑制劑(諸如抗PD-1/抗PD-L1 Ab)之組合形式用於治療本文中所揭示之全部範圍之癌症。

【0203】 所揭示之本發明之一個態樣需要使用本發明之經分離之抗CCR8 Ab或其抗原結合部分來製備用於治療罹患癌症之個體之藥劑。抗CCR8 Ab可單獨或與檢查點抑制劑(諸如經分離之抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原結合部分)組合用於製備用以治療癌症患者之藥劑。任何此類抗CCR8 Ab及抗PD-1/抗PD-L1 Ab用於製備藥劑之用途廣泛適用於本文中所揭示之全部範圍之癌症。

【0204】 本發明亦提供抗CCR8 Ab或其抗原結合部分與檢查點抑制劑(諸如經分離之抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原結合部分)之組合，其係用於對應於使用本文中所描述之此治療劑組合之治療方法之所有實施例的治療癌症之方法中。

【0205】

適用於所揭示之治療方法之抗CCR8 Ab

適用於所揭示之方法之抗CCR8 Ab為經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其以高特異性及親和力特異性結合於表現於細胞表面上之CCR8且介導藉由ADCC進行之CCR8表現細胞之消耗。此類Ab呈現對於治療功效而言重要的一或多種特性。特定言之，經分離之Ab或其抗原結合部分呈現以下特性中之至少一者：

(a) 以約20 nM或更低，較佳約2 nM或更低，較佳約1或更低的EC_{50}特異性結合於表現於細胞表面上之CCR8；

(b) 特異性結合於胸腺之髓質及皮膚之真皮中之稀少及分散的免疫細胞，但不結合於例如人類大腦、小腦、心臟、肝臟、肺、腎臟、扁桃體、脾、胸腺、結腸、胃、胰臟、腎上腺、垂體、皮膚、周邊神經、睪丸或子宮組織或PBMC。舉例而言，抗CCR8 mAb或其抗原結合部分可特異性結

合於腫瘤浸潤性Treg，但不結合於PBMC，例如，在固定的PBMC中不展示細胞質染色。舉例而言，可藉由例如在固定的組織樣品上用相關Ab進行標準染色(例如，藉由實例14中描述之方法)來確定Ab不與上述清單中之細胞及組織結合；

(c) 以約5 nM或更低之IC_{50}抑制CCL1與CCR8之結合及抑制CCR8/CCL1信號傳導；

(d) 當結合於細胞表面上之CCR8時，以約100 pM或更低，較佳約60 pM或更低，較佳約40 pM或更低，更佳約13 pM或更低，更佳10 pM或更低之EC_{50}介導細胞之消耗；

(e) 當在存在或不存在交聯Ab之情況下結合於細胞表面上之CCR8時，不引起CCR8之內化；

(f) 當以單藥療法形式投與個體時，抑制個體中之腫瘤細胞之生長；及

(g) 當與其他治療劑組合投與個體以用於治療癌症時，抑制個體中之腫瘤細胞之生長，視情況其中其他治療劑為免疫檢查點抑制劑，視情況其中檢查點抑制劑為抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 Ab。

【0206】 在某些實施例中，經分離之Ab或其抗原結合部分呈現至少2或3種，較佳4、5或6種前述特性。在更佳實施例中，經分離之Ab或其抗原結合部分呈現所有前述特性。舉例而言，在某些較佳實施例中，經分離之Ab或其抗原結合部分：

(a) 以約20 nM或更低，較佳約2 nM或更低，較佳約1或更低的EC_{50}特異性結合於表現於細胞表面上之CCR8；

(b) 當結合於細胞表面上之CCR8時，以約100 pM或更低，約60 pM

或更低，較佳約40 pM或更低，更佳約13 pM或更低，更佳10 pM或更低之EC_{50}介導細胞之消耗；

(c) 當以單藥療法形式投與個體時，抑制個體中之腫瘤細胞之生長；及

(d) 當與其他治療劑組合投與個體以用於治療癌症時，抑制個體中之腫瘤細胞之生長，視情況其中其他治療劑為檢查點抑制劑。

【0207】 在其他較佳實施例中，經分離之Ab或其抗原結合部分：

(a) 以約2 nM或更低之EC_{50}特異性結合於表現於細胞表面上之CCR8；

(b) 當結合於細胞表面上之CCR8時，以約40 pM或更低之EC_{50}介導細胞之消耗；及

(c) 當與其他治療劑組合投與個體以用於治療癌症時，抑制個體中之腫瘤細胞之生長，視情況其中其他治療劑為抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 Ab。

【0208】 在某些實施例中，呈現一或多種，至多所有前述功能特性之經分離之Ab，例如mAb，或其抗原結合部分進一步以約10 nM或更低之K_D結合於位於hCCR8之N端域中之抗原決定基，其中抗原決定基包含具有序列$Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$ (SEQ ID NO:2)以及硫酸化tyr-15及/或tyr-17殘基之肽。在某些其他實施例中，呈現一或多種，至多所有前述功能特性之經分離之Ab，例如mAb，或其抗原結合部分進一步以約10 nM或更低之K_D結合於位於人類CCR8之N端域中之抗原決定基，其中抗原決定基包含具有序列$V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_19I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)以及硫酸化tyr-15及tyr-17殘基之肽。

【0209】在某些實施例中，經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分可具有以上特性及/或包含以下中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域：V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸。舉例而言，此類Ab或其抗原結合部分可包含如由Kabat方法定義之以下CDR：重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:33所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:34所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:35所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:36所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:37所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:38所闡述之序列的連續連接之胺基酸。作為另一實例，此類Ab或其抗原結合部分可包含V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸。作為另一實例，此類Ab可包含重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:100所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:112所闡述之序列的連續連接之胺基酸。視情況地，Ab之重鏈具有降低之岩藻醣基化作用，或具有低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之重鏈恆定區，如本文中其他地方所描述。

【0210】在某些實施例中，經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分可具有以上特性及/或包含以下中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域：V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之

胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸。舉例而言，此類Ab或其抗原結合部分可包含如由Kabat方法定義之以下CDR：重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:103所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:104所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:105所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:106所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:107所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:108所闡述之序列的連續連接之胺基酸。作為另一實例，此類Ab或其抗原結合部分可包含V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸。作為另一實例，此類Ab可包含重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:117所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:118所闡述之序列的連續連接之胺基酸。視情況地，Ab之重鏈具有降低之岩藻醣基化作用，或具有低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之重鏈恆定區，如本文中其他地方所描述。

【0211】 在某些實施例中，經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分可具有以上特性及/或包含以下中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域：V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸。舉例而言，此類Ab或其抗原結合部分可包含重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:45所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變

區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:46所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:47所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:48所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:49所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:50所闡述之序列的連續連接之胺基酸。在另一實例中，此類Ab或其抗原結合部分可包含V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸。在另一實例中，此類Ab可包含重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸。視情況地，Ab之重鏈具有降低之岩藻醣基化作用，或具有低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之重鏈恆定區，如本文中其他地方所描述。

【0212】

組合療法

人類CCR8$^+$ Treg亦共同表現大量PD-1 (資料未展示)。用抗PD-1 mAb進行之治療可活化PD-1+ Treg，潛在地解釋用尼沃單抗治療之胃癌患者中之過度進展或原發性抗性(Kamada等人, 2019)。因此，Treg消耗可能改良對抗PD-1療法之總體反應率。此組合亦由臨床前小鼠研究直接支持，其中在MB49及4T-1腫瘤模型中觀測到抗CCR8與抗PD-1之協同作用(實例27及28)。

【0213】 儘管本文中已使用抗PD-1 Ab證明用抗CCR8 Ab與檢查點抑制劑進行之組合療法之功效，但已鑑別調節T細胞反應之若干其他共刺

激性及抑制性受體及配位體。刺激性受體之實例包括可誘導型T細胞共刺激劑(ICOS)、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40)、CD27、糖皮質素誘導之TNFR相關蛋白(GITR)及疱疹病毒侵入介體(HVEM)，而除PD-1/PD-L1以外，抑制性受體之實例包括細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白質4 (CTLA-4)、B及T淋巴細胞弱化子(BTLA)、T細胞免疫球蛋白及黏蛋白域-3 (TIM-3)、淋巴細胞活化基因-3 (LAG-3)、殺手免疫球蛋白樣受體(KIR)、腺苷A2A受體(A2aR)、殺手細胞凝集素樣受體G1 (KLRG-1)、自然殺手細胞受體2B4 (CD244)、CD160、具有Ig及ITIM域之T細胞免疫受體(TIGIT)以及T細胞活化之V域Ig抑制因子(VISTA)之受體(Mellman等人, 2011；Pardoll, 2012；Baitsch等人, 2012)。此等受體及其配位體提供治療劑之目標，該等治療劑經設計以刺激免疫反應或防止免疫反應之抑制，以便由此攻擊腫瘤細胞(Weber, 2010；Mellman等人, 2011；Pardoll, 2012)。刺激性受體或受體配位體係由促效劑靶向，而抑制性受體或受體配位體係由阻斷劑靶向。因為許多免疫檢查點係由配位體-受體相互作用啟動，所以其可容易地藉由Ab來阻斷或藉由配位體或受體之重組形式來調節。除PD-1/PD-L1以外，調節T細胞反應之共刺激性及抑制性受體及配位體中之一或多者可提供與本文中所揭示之抗CCR8 Ab發揮協同作用以抑制腫瘤生長之目標。舉例而言，在某些實施例中，將抗CCR8 Ab與抗CTLA-4 Ab組合。在其他實施例中，將抗CCR8 Ab與抗LAG-3 Ab組合。

【0214】 放射線療法在鼠類模型(Muroyama等人, 2017)及人類(未公開之資料)中引起治療後之Treg浸潤之增加。Treg浸潤增加可引起抗腫瘤免疫之不合需要的抑制，且CCR8介導之消耗可增強放射療法之功效。

【0215】 本發明提供抗CCR8 mAb，其藉由增強治療(諸如檢查點抑

制或放射線療法)之抗腫瘤功效來有效增強免疫反應且其呈現以下合乎需要的特徵中之至少一種、若干種或全部：(a)以約1 nM或更低之EC_{50}特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8；(b)特異性結合於胸腺之髓質及皮膚之真皮中之稀少及分散的免疫細胞，但不結合於例如人類大腦、小腦、心臟、肝臟、肺、腎臟、扁桃體、脾、胸腺、結腸、胃、胰臟、腎上腺、垂體、皮膚、周邊神經、睪丸或子宮組織或PBMC。舉例而言，抗CCR8 mAb或其抗原結合部分可特異性結合於腫瘤浸潤性Treg，但不結合於PBMC，例如，在固定的PBMC中不展示細胞質染色。舉例而言，可藉由用相關Ab對例如固定的組織樣品進行標準染色(例如，藉由實例14中所描述之方法)來確定Ab不與上述清單中之細胞及組織結合；(c)以約5 nM或更低之IC_{50}抑制CCL1與CCR8之結合及抑制CCR8/CCL1信號傳導；(d)當結合於細胞表面上之CCR8時，以約50 pM或更低之EC_{50}介導細胞之消耗；(e)在存在或不存在交聯Ab之情況下結合於細胞表面上之CCR8時，不引起CCR8之內化；(f)當以單藥療法形式投與個體時，抑制個體中之腫瘤細胞之生長；及(g)當與其他治療劑組合投與個體以用於治療癌症時，抑制個體中之腫瘤細胞之生長，視情況其中其他治療劑為抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 Ab。

【0216】 可用於本文中所描述之治療方法、組合物或套組中之某些抗CCR8 mAb包括以高親和力特異性結合於細胞表面上之hCCR8、以約10 pM或更低之EC_{50}介導細胞之消耗及呈現至少兩種其他且較佳所有前述特性之mAb。在某些實施例中，經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分可具有以上特性中之至少一者及/或包含以下中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域：V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續

連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸。舉例而言，此類Ab或其抗原結合部分可包含如由Kabat方法定義之以下CDR：V_H CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:33所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_H CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:34所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_H CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:35所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_L CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:36所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_L CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:37所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及V_L CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:38所闡述之序列的連續連接之胺基酸。在另一實例中，此類Ab或其抗原結合部分可包含V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸。在另一實例中，此類Ab可包含重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:100所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:112所闡述之序列的連續連接之胺基酸。視情況地，Ab之重鏈具有降低之岩藻醣基化作用，或具有低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之重鏈恆定區，如本文中其他地方所描述。

【0217】 在某些實施例中，經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分可具有以上特性中之至少一者及/或包含以下中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域：V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸。舉例而言，此類Ab或其抗原結合部分可包含如由Kabat方法定義之以下CDR：V_H CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:103所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_H CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:104所

闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_H CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:105所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_L CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:106所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_L CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:107所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及V_L CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:108所闡述之序列的連續連接之胺基酸。作為另一實例，此類Ab或其抗原結合部分可包含V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸。作為另一實例，此類Ab可包含重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:117所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:118所闡述之序列的連續連接之胺基酸。視情況地，Ab之重鏈具有降低之岩藻醣基化作用，或具有低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之重鏈恆定區，如本文中其他地方所描述。

【0218】 在某些實施例中，經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分可具有以上特性中之至少一者及/或包含以下中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域：V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸。舉例而言，此類Ab或其抗原結合部分可包含如由Kabat方法定義之以下CDR：V_H CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:45所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_H CDR2，包含具有如SEQ ID NO:46所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_H CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:47所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_L CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:48所闡述之序列的連續連接之胺基酸；V_L CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:49所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及V_L CDR3，其包含具有如

SEQ ID NO:50所闡述之序列的連續連接之胺基酸。在另一實例中，此類Ab或其抗原結合部分可包含V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸。在另一實例中，此類Ab或其抗原結合部分可包含重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸。視情況地，Ab之重鏈具有降低之岩藻醣基化作用，或具有低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之重鏈恆定區，如本文中其他地方所描述。

【0219】

適用於所揭示之治療方法之抗PD-1/抗PD-L1 Ab

適用於本文中所揭示之用於癌症治療之方法、組合物或套組之抗PD-1 Ab包括經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其以高特異性及親和力結合於PD-1、阻斷PD-L1及/或PD-L2與PD-1之結合且抑制PD-1信號傳導路徑之免疫抑制作用。類似地，適用於此等方法之抗PD-L1 Ab為經分離之Ab，較佳mAb，或其抗原結合部分，其以高特異性及親和力結合於PD-L1、阻斷PD-L1與PD-1及CD80 (B7-1)之結合且抑制PD-1信號傳導路徑之免疫抑制作用。在本文中所揭示之治療方法中之任一者中，抗PD-1或抗PD-L1 Ab分別包括結合於PD-1受體或PD-L1配位體之抗原結合部分或片段，且在抑制受體-配位體結合及逆轉T細胞活性之抑制方面呈現與完全Ab類似之功能特性，藉此上調免疫反應。

【0220】

抗PD-1 mAb

以高親和力特異性結合於PD-1之mAb已揭示於美國專利案第

8,008,449號中。其他抗PD-1 mAb已描述於例如美國專利案第7,488,802號、第8,168,757號、第8,354,509號及第9,205,148號中。已證明美國專利案第8,008,449號中所揭示之抗PD-1 mAb呈現若干種或所有以下特徵：(a)以約50 nM或更低之K_D結合於人類PD-1，如藉由SPR (BIACORE®)生物感測器系統所測定；(b)實質上不結合於人類CD28、CTLA-4或ICOS；(c)在混合淋巴細胞反應物(MLR)分析法中增加T細胞增殖、干擾素-γ產生及IL-2分泌；(d)結合於人類PD-1及食蟹獼猴PD-1；(e)抑制PD-L1及PD-L2與PD-1之結合；(f)緩解由Treg細胞引起的對CD4+CD25- T細胞之增殖及干擾素-γ產生之抑制；(g)刺激抗原特異性記憶反應；(h)刺激Ab反應；及(i)活體內抑制腫瘤細胞生長。可用於所揭示之治療方法、組合物或套組中之抗PD-1 Ab包括以高親和力特異性結合於人類PD-1且呈現至少五種且較佳所有前述特徵之mAb。舉例而言，適用於本文中所揭示之治療方法之抗PD-1 Ab：(a)以約10 nM至0.1 nM之K_D結合於人類PD-1，如藉由SPR (BIACORE®)所測定；(b)在MLR分析法中增加T細胞增殖、干擾素-γ產生及IL-2分泌；(c)抑制PD-L1及PD-L2與PD-1之結合；(d)逆轉由Treg引起的對$CD4^+CD25^-$ T細胞之增殖及干擾素-γ產生之抑制；(e)刺激抗原特異性記憶反應；及(f)活體內抑制腫瘤細胞生長。

【0221】其他抗PD-1 mAb已描述於例如美國專利案第6,808,710號、第7,488,802號、第8,168,757號及第8,354,509號、美國公開案第2016/0272708號以及PCT公開案第WO 2008/156712號、第WO 2012/145493號、第WO 2014/179664號、第WO 2014/194302號、第WO 2014/206107號、第WO 2015/035606號、第WO 2015/085847號、第WO 2015/112800號、第WO 2015/112900號、第WO 2016/106159號、第WO

2016/197367號、第WO 2017/020291號、第WO 2017/020858號、第WO 2017/024465號、第WO 2017/024515號、第WO 2017/025016號、第WO 2017/025051號、第WO 2017/040790號、第WO 2017/106061號、第WO 2017/123557號、第WO 2017/132827號、第WO 2017/133540中，其各自之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

【0222】 在某些實施例中，抗PD-1 mAb係選自由以下組成之群：尼沃單抗(OPDIVO®；先前稱為5C4、BMS-936558、MDX-1106或ONO-4538)、派立珠單抗(KEYTRUDA®；先前稱為拉立珠單抗(lambrolizumab)及MK-3475；參見WO 2008/156712A1)、PDR001 (參見WO 2015/112900)、MEDI-0680 (先前稱為AMP-514；參見WO 2012/145493)、REGN-2810 (參見WO 2015/112800)、JS001 (參見Liu及Wu, 2017)、BGB-A317 (參見WO 2015/035606及US 2015/0079109)、INCSHR1210 (SHR-1210；參見WO 2015/085847；Liu及Wu, 2017)、TSR-042 (ANB011；參見WO 2014/179664)、GLS-010 (WBP3055；參見Liu及Wu, 2017)、AM-0001 (參見WO 2017/123557)、STI-1110 (參見WO 2014/194302)、AGEN2034 (參見WO 2017/040790)及MGD013 (參見WO 2017/106061)。

【0223】 在本文中所描述之包含抗PD-1 Ab之投藥的任何治療方法之某些較佳實施例中，抗PD-1 Ab為尼沃單抗(OPDIVO®)，其已由美國食品及藥物管理局(U.S. Food and Drug Administration；FDA)批准用於治療多種不同癌症。尼沃單抗為完全人類IgG4 (S228P)PD-1免疫檢查點抑制劑Ab，其選擇性地阻止與PD-1配位體(PD-L1及PD-L2)之相互作用，藉此阻斷抗腫瘤T細胞功能之下調(在美國專利案第8,008,449號中描述為

mAb C5；Wang等人, 2014)。在其他較佳實施例中，抗PD-1 Ab為派立珠單抗(KEYTRUDA®；針對PD-1之人類化單株IgG4 Ab且在美國專利案第8,354,509號中描述為h409A11)，其亦被批准用於多種癌症適應症。

【0224】 可用於所揭示之方法、組合物或套組中之抗PD-1 Ab亦包括經分離之Ab，較佳mAb，其特異性結合於人類PD-1 (hPD-1)且與本文中所描述之抗PD-1 Ab中之任一者(例如，尼沃單抗(5C4；參見例如美國專利案第8,008,449號；WO 2013/173223)及派立珠單抗)交叉競爭結合於人類PD-1。與參考Ab (例如，尼沃單抗或派立珠單抗)交叉競爭結合於抗原(在此情況下，人類PD-1)之Ab可在標準PD-1結合分析法(諸如BIACORE®分析、ELISA分析法或流式細胞測量術)中容易地鑑別(參見例如，WO 2013/173223)。在某些實施例中，抗PD-1 Ab與本文中所描述之抗PD-1 Ab中之任一者(例如，尼沃單抗或派立珠單抗)結合於相同抗原決定基。

【0225】 可用於所揭示之本發明之方法中的抗PD-1 Ab還包括抗原結合部分，包括Fab、$F(ab')_2$、Fd或Fv片段、sdAb、scFv、二-scFv或雙-scFv、雙功能抗體、微型抗體或經分離之CDR (關於其他細節，參見Hollinger及Hudson, 2005；Olafsen及Wu, 2010)。

【0226】 在某些實施例中，經分離之抗PD-1 Ab或其抗原結合部分包含具有人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同型之重鏈恆定區。在某些較佳實施例中，抗PD-1 Ab或其抗原結合部分包含具有人類IgG4同型之重鏈恆定區。在其他實施例中，抗PD-1 Ab或其抗原結合部分具有人類IgG1同型。在某些其他實施例中，抗PD-1 Ab或其抗原結合部分之IgG4重鏈恆定區含有S228P突變(使用系統編號；Kabat等人, 1983)，其用通常在IgG1同

型Ab中之相應位置處發現的脯胺酸殘基置換鉸鏈區中之絲胺酸殘基。存在於尼沃單抗中之此突變防止Fab臂與內源性IgG4 Ab交換，同時保留與野生型IgG4 Ab相關之活化Fc受體之低親和力(Wang等人, 2014)。在其他實施例中，Ab包含輕鏈恆定區，其為人類κ或λ恆定區。

【0227】 在本發明之方法之其他實施例中，抗PD-1 Ab或其抗原結合部分為mAb或其抗原結合部分。關於對人類個體之投藥，抗PD-1 Ab較佳為嵌合Ab或更佳為人類化或人類Ab。此類嵌合、人類化或人類mAb可藉由此項技術中熟知之方法製備及分離，例如美國專利案第8,008,449號中所描述。

【0228】

抗PD-L1 mAb

因為抗PD-1及抗PD-L1靶向相同信號傳導路徑且已在臨床試驗中證實在各種癌症中呈現類似的功效水準(參見例如，Brahmer等人, 2012; WO 2013/173223)，因此抗PD-L1 Ab可取代本文中所揭示之組合療法方法中之抗PD-1 Ab。

【0229】 適用於所揭示之方法、組合物或套組之抗PD-L1 Ab為經分離之Ab，其以高特異性及親和力結合於PD-L1、阻斷PD-L1與PD-1及CD80之結合且抑制PD-1信號傳導路徑之免疫抑制作用。以高親和力特異性結合於PD-L1之mAb已揭示於美國專利案第7,943,743號中。其他抗PD-L1 mAb已描述於例如美國專利案第8,217,149號、第8,779,108號、第9,175,082號及第9,624,298號，及PCT公開案第WO 2012/145493號。已證明美國專利案第7,943,743號中所揭示之抗PD-1 HuMAb呈現以下特徵中之一或多者：(a)以約50 mM或更低之K_D結合於人類PD-1，如藉由SPR

(BIACORE®)所測定；(b)在MLR分析法中增加T細胞增殖、干擾素-γ產生及IL-2分泌；(c)刺激Ab反應；(d)抑制PD-L1與PD-1之結合；及(e)逆轉Treg對T細胞效應細胞及/或樹突狀細胞之抑制作用。用於本文中所揭示之治療方法中之抗PD-L1 Ab包括經分離之Ab，較佳mAb，其以高親和力特異性結合於人類PD-L1且呈現至少一種，在一些實施例中至少三種，且較佳所有前述特徵。舉例而言，適用於此等方法之抗PD-L1 Ab：(a)以約50 mM至0.1 mM之K_D結合於人類PD-1，如藉由表面電漿共振(BIACORE®)所測定；(b)在MLR分析法中增加T細胞增殖、干擾素-γ產生及IL-2分泌；(c)抑制PD-L1與PD-1及CD80之結合；及(d)逆轉Treg對T細胞效應細胞及/或樹突狀細胞之抑制作用。

【0230】 適用於本發明之方法之抗PD-L1為BMS-936559 (先前稱為MDX-1105；在美國專利案第7,943,743號中稱為12A4)。其他適合的抗PD-L1 Ab包括阿特珠單抗(TECENTRIQ®；先前稱為RG7446及MPDL3280A；在美國專利案第8,217,149號中稱為YW243.55S70；亦參見Herbst等人, 2014)、德瓦魯單抗(IMFINZI®；先前稱為MEDI-4736；在美國專利案第8,779,108號中稱為2.14H9OPT)、艾維路單抗(BAVENCIO®；先前稱為MSB-0010718C；在美國專利案第9,624,298號中稱為A09-246-2)、STI-A1014 (在美國專利案第9,175,082號中稱為H6)、CX-072 (參見WO 2016/149201)、KN035 (參見Zhang等人, 2017)、LY3300054 (參見例如WO 2017/034916)及CK-301 (參見Gorelik等人, 2017)。

【0231】 在本文中所描述之包含抗PD-L1 Ab之投藥的治療方法中之任一者之某些較佳實施例中，抗PD-L1 Ab為阿特珠單抗

(TECENTRIQ®)。在其他較佳實施例中，抗PD-L1 Ab為德瓦魯單抗(IMFINZI®)。在其他較佳實施例中，抗PD-L1 Ab為艾維路單抗(BAVENCIO®)。

【0232】 適用於所揭示之方法、組合物或套組之抗PD-L1 Ab亦包括經分離之Ab，其特異性結合於人類PD-L1且與參考Ab交叉競爭結合於人類PD-L1，該參考Ab可為本文中所揭示之抗PD-L1 Ab中之任一者，例如BMS-936559 (12A4；參見例如美國專利案第7,943,743號；WO 2013/173223)、阿特珠單抗、德瓦魯單抗、艾維路單抗或STI-A1014。Ab與參考Ab交叉競爭結合於人類PD-L1之能力表明此類Ab與參考Ab結合於PD-L1之相同的抗原決定基區域且借助於結合於PD-L1之實質上相同的抗原決定基區域，預期具有與參考Ab極類似的功能特性。在一些實施例中，抗PD-L1 Ab與本文中所描述之抗PD-L1 Ab中之任一者(例如，阿特珠單抗、德瓦魯單抗、艾維路單抗或STI-A1014)結合於相同的抗原決定基。可在標準PD-L1結合分析法(諸如BIACORE®分析、ELISA分析法或熟習此項技術者熟知的流式細胞測量術，參見例如WO 2013/173223)中基於與參考Ab (諸如阿特珠單抗或艾維路單抗)交叉競爭之能力而容易地鑑別交叉競爭性Ab。

【0233】 在某些較佳實施例中，用於本發明之方法中的經分離之抗PD-L1 Ab為mAb。在其他實施例中，尤其對於人類個體之投藥，此等Ab較佳為嵌合Ab或更佳為人類化或人類Ab。嵌合、人類化或人類Ab可藉由此項技術中熟知之方法製備及分離，例如美國專利案第7,943,743號中所描述。

【0234】 在某些實施例中，抗PD-L1 Ab或其抗原結合部分包含具有

人類IgGl、IgG2、IgG3或IgG4同型之重鏈恆定區。在某些其他實施例中，抗PD-L1 Ab或其抗原結合部分具有IgG4同型之人類IgGl。在其他實施例中抗PD-L1 Ab或其抗原結合部分之IgG4重鏈恆定區之序列含有S228P突變。在其他實施例中，Ab包含輕鏈恆定區，其為人類κ或λ恆定區。

【0235】 本發明之抗PD-L1 Ab亦包括以上Ab之抗原結合部分，包括Fab、$F(ab')_2$、Fd、Fv及scFv、二-scFv或雙-scFv以及scFv-Fc片段、奈米抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體及經分離之CDR，其結合於PD-L1且在抑制受體結合及上調免疫系統方面呈現與完全Ab類似之功能特性。

【0236】

醫藥組合物及給藥方案

本文中所揭示且用於所描述之治療方法中之任一者之mAb可組成組合物，例如，含有Ab及醫藥學上可接受之載劑之醫藥組合物。本發明亦提供組合物，其包含所揭示之免疫結合物或雙特異性分子中之任一者及醫藥學上可接受之載劑。如本文中所使用，「醫藥學上可接受之載劑」包括生理學上相容之任何及所有溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑以及其類似物。較佳地，用於含有Ab之組合物之載劑適用於靜脈內(IV)、肌肉內、皮下(SC)、腸胃外、脊椎或表皮投藥(例如，藉由注射或輸注)。

【0237】 用於SC注射之方案係基於涉及Ab (例如，mAb)與重組人類玻尿酸酶(rHuPH20)之共同調配之Halozyme Therapeutics之ENHANZE®藥物遞送技術，其消除由細胞外基質造成的對可皮下遞送之

生物製劑及藥物之體積之傳統限制(美國專利案第7,767,429號)。有可能將組合療法中使用之兩種Ab共同調配成單一組合物以用於SC投藥。

【0238】 本發明之醫藥組合物可包括一或多種醫藥學上可接受之鹽、抗氧化劑、水性及非水性載劑及/或佐劑，諸如防腐劑、濕潤劑、乳化劑及分散劑。

【0239】 調節給藥方案以提供最佳所需反應，例如最大治療反應及/或最小副作用。對於抗CCR8、抗PD-1或抗PD-L1 Ab或其抗原結合部分之投藥(包括用於組合使用)，劑量可在每公斤個體體重約0.01至約20毫克，較佳約0.1至約10毫克範圍內。舉例而言，劑量可為每公斤體重約0.1、0.3、1、2、3、5或10毫克且更佳為每公斤體重約0.3、1、3或10毫克。或者，代替基於體重之劑量，可投與固定或均一劑量之Ab或其抗原結合部分，例如約0.1至約2,000 mg，較佳約1至約1,000 mg，諸如約0.3、1、3、5、10、30、60、100、150、200、240、300、400、500、600、800或1,000 mg。均一(對比基於重量)給藥由於易於製備、降低藥物誤差之風險及觀測到對於大部分生物製劑，兩種給藥方法可以類似方式進行而具有吸引力(Wang等人, 2009)。

【0240】 給藥方案通常基於Ab之典型藥物動力學特性而經設計以實現引起持續受體佔有率(RO)之暴露。例示性治療方案需要每週一次、每2週一次、每3週一次、每4週一次、每月一次、每3-6個月或更長時間一次投藥。在某些較佳實施例中，每2週一次向個體投與抗CCR8、抗PD-1或抗PD-L1 Ab或其抗原結合部分。在其他較佳實施例中，每3週一次或每4週一次投與Ab或其抗原結合部分。在治療過程期間，劑量及時程可改變。使用由基於藥理學及毒理學之方法之混合方法產生的全部資料獲得

4A19之首次用於人體(FIH)之起始均一劑量，即0.3 mg (4 μg/kg)，IV，Q2W，以確保足夠的安全性同時最小化參與者對潛在次有效劑量之暴露及細胞介素釋放之風險。

【0241】 在實例34中所描述之臨床試驗中，使用由基於藥理學及毒理學之方法之混合方法產生的全部資料測定首次用於人體(FIH)之臨床研究中使用之劑量。在抗CCR8單藥療法組之劑量遞增階段中，每2週一次(Q2W)向個體靜脈內(IV)投與0.3、1、3、10、30、100、300或800 mg之均一劑量之4A19。在組合療法組中，在劑量遞增階段中投與相同劑量之4A19及每4週一次(Q4W)以FDA認可之480 mg之均一劑量靜脈內投與之尼沃單抗。對於劑量擴增，開放單一組及隨機化組以包括來自遞增階段之不同腫瘤類型及劑量水準，且繼續以單藥療法或組合療法形式進行之治療直至出現進展、不可接受之毒性、撤回同意書、完成26個研究療法循環(104週)或研究結束(以首先發生的為準)。

【0242】 因此，在所揭示之療法方法之某些實施例中，以約0.3至約800 mg Q2W之均一劑量，以單藥療法或與免疫檢查點抑制劑(例如，抗PD-1或抗PD-L1 Ab)之組合形式向個體投與抗CCR8 Ab。更特定言之，在某些實施例中，以0.3、1、3、10、30、100、300或800 mg Q2W投與抗CCR8 Ab。在某些較佳實施例中，抗CCR8 Ab為mAb 4A19。在其他較佳實施例中，抗CCR8 Ab為mAb 14S5或14S15h。在某些實施例中，以3 mg Q2W之均一劑量向個體投與抗CCR8 Ab。在某些其他實施例中，以10 mg Q2W投與抗CCR8 Ab。在其他實施例中，以30 mg Q2W之均一劑量投與抗CCR8 Ab。在其他實施例中，以100 mg Q2W之均一劑量向個體投與抗CR8 Ab。

【0243】 對於組合療法，在某些實施例中，免疫檢查點抑制劑為抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 Ab。在某些較佳實施例中，抗PD-1 Ab為尼沃單抗。在較佳實施例中，以480 mg Q4W之均一劑量向個體投與尼沃單抗。

【0244】 當以組合形式使用時，可使用次治療劑量之一種或兩種Ab，例如抗CCR8、抗PD-1及/或抗PD-L1 Ab或其抗原結合部分之劑量。如本文中所使用，治療劑(諸如治療性Ab)之「次治療」劑量或給藥係指低於典型或經認可之單藥療法劑量之劑量。舉例而言，低於最初由FDA批准之每2週3 mg/kg之尼沃單抗之劑量(例如每2、3或4週1.0 mg/kg或更少)被視為次治療劑量。隨後FDA批准尼沃單抗以每兩週240 mg或每4週480 mg使用。因此，舉例而言，低於所批准之每4週480 mg之尼沃單抗之給藥(例如，每2、3或4週120 mg或更少)被視為次治療給藥。來自接收0.3 mg/kg至10 mg/kg之尼沃單抗給藥之15名個體的RO資料表明PD-1佔有率在此劑量範圍內似乎與劑量無關。在所有劑量中，平均佔有率為85% (範圍為70%至97%)，其中平均平台佔有率為72% (範圍為59%至81%)(Brahmer等人, 2010)。因此，以0.3 mg/kg進行之給藥可實現充分暴露，以產生顯著生物製劑活性。

【0245】 相比之下，如本文中所使用，治療劑(諸如治療性Ab)之「次有效」劑量或給藥係指低於顯著生物製劑活性所需之劑量且因此在以單藥療法或組合療法形式投與時不引起任何有意義的治療作用之劑量。

【0246】 在小鼠腫瘤模型中觀測到的抗CCR8與抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原結合部分之間的協同相互作用可允許以次治療劑量向癌症患者投與此等治療劑中之一或兩者。在所揭示之組合療法方法之某些實施例

中，以次治療劑量向癌症患者投與抗CCR8 Ab或其抗原結合部分。在其他實施例中，以次治療劑量向患者投與抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原結合部分。在其他實施例中，各自以次治療劑量向患者投與抗PD-1/抗PD-L1及抗CCR8 Ab或其抗原結合部分。

【0247】 與以單藥療法形式使用較高劑量之個別Ab相比，此類次治療劑量之一種或兩種Ab之投藥可減少不良事件。因此，所揭示之組合療法方法之成功之處不僅可體現在Ab之組合與用此等Ab進行之單藥療法相比改良之功效，且亦體現在組合使用較低劑量之藥物與單藥療法劑量相比增加之安全性，亦即，降低之不良事件發生率。

【0248】 在本文中所揭示之任何方法之某些實施例中，抗CCR8、抗PD-1及/或抗PD-L1 Ab經調配以用於靜脈內(IV)投藥或皮下(SC)注射。在某些實施例中，向個體依序投與抗CCR8 Ab或其抗原結合部分及抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原結合部分。「依序」投藥意謂在抗CCR8及抗PD-1/抗PD-L1 Ab中之一者之前投與另一者。可首先投與任一種Ab；亦即，在某些實施例中，在抗CCR8 Ab之前投與抗PD-1/抗PD-L1 Ab，而在其他實施例中，在抗PD-1/抗PD-L1 Ab之前投與抗CCR8 Ab。在某些實施例中，藉由IV輸注，舉例而言，藉由經約60分鐘時段之輸注投與各Ab。在其他實施例中，藉由SC注射來投與至少一種Ab。

【0249】 在依序IV投藥之某些實施例中，出於患者便利性，抗CCR8及抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其部分係在彼此間隔30分鐘內投與。通常，當在同一天藉由IV投藥來遞送抗CCR8及抗PD-1/抗PD-L1 Ab時，每次輸注使用單獨的輸注袋及過濾器。在第一Ab之輸注之後立即進行生理鹽水沖洗，以在開始第二Ab之輸注之前清洗Ab之管線。在其他實施例

中，兩種Ab係在彼此間隔1、2、4、8、24或48小時內投與。

【0250】 藉由SC投藥進行的至少一種Ab之遞送可減少醫療保健從業人員進行投藥所需之時間且縮短藥物投藥之時間。舉例而言，使用SC注射可將IV投藥所需之時間(通常約30-60分鐘)縮短至約5分鐘。在依序SC投藥之某些實施例中，抗CCR8及抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其部分係在彼此間隔10分鐘內投與。

【0251】 因為已證實部分歸因於免疫系統之記憶組分，檢查點抑制劑Ab可產生極持久的反應(參見例如WO 2013/173223；Lipson等人, 2013；Wolchok等人, 2013)，所投與之抗PD-1/抗PD-L1 Ab之活性可持續數週、數月或甚至數年。在某些實施例中，本發明之涉及依序投藥之組合療法方法需要向先前已用抗PD-1/抗PD-L1 Ab治療之患者投與抗CCR8 Ab。在其他實施例中，向先前已用及計劃用抗PD-1/抗PD-L1 Ab治療之患者投與抗CCR8 Ab。在其他實施例中，本發明之涉及依序投藥之組合療法方法需要向先前已用抗CCR8 Ab治療之患者，視情況地，在用抗CCR8 Ab治療之後癌症仍有進展之患者投與抗PD-1/抗PD-L1 Ab。

【0252】 在某些其他實施例中，同時投與抗PD-1/抗PD-L1及抗CCR8 mAb，以摻合為用於同時投藥之醫藥學上可接受之調配物中之單一組合物形式，或以其中各Ab以醫藥學上可接受之組合物形式調配之單獨的組合物形式同時進行。在某些較佳實施例中，抗PD-1/抗PD-L1及抗CCR8 mAb係以單獨的組合物形式同時投與，其中各Ab係以醫藥學上可接受之組合物形式調配。在其他實施例中，抗PD-1/抗PD-L1及抗CCR8 mAb係以醫藥學上可接受之調配物中之單一組合物形式同時投與。

【0253】 本發明提供低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之經分離之

Ab，較佳mAb，其特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8，其中經分離之Ab包含重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸，該Ab係用於治療罹患癌症之個體之方法，其中癌症係選自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合區癌症及子宮頸癌。

【0254】 在某些實施例中，本發明亦提供低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之經分離之Ab，較佳mAb，其特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8，其中經分離之Ab包含重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸，該Ab係用於與另一種治療劑組合治療罹患癌症之個體之方法中，其中該癌症係選自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合區癌症及子宮頸癌，且其中該其他治療劑為抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 Ab。

【0255】 在某些其他實施例中，本發明亦提供低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之經分離之Ab，較佳mAb，其特異性結合於表現於細胞表面上之hCCR8，其中經分離之Ab包含重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸，該Ab係用於與另一種治療劑組合治療罹患癌症之個體之方法中，其中該癌症係選自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合區癌症及子宮頸癌，其中該其他治療劑為尼沃單抗，且其中以每2週一次1-30 mg之劑量向個體投與抗CCR8 Ab且以每2週一次240 mg或每4週一次480 mg之劑量向個體投與尼沃單抗。

【0256】 本發明亦提供一種用於治療罹患癌症之個體之方法，其包

含向個體投與治療有效量之低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之抗CCR8 mAb使得個體得到治療，該mAb包含重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸，其中該癌症係選自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合區癌症及子宮頸癌。

【0257】 在某些實施例中，本發明亦提供一種用於治療罹患癌症之個體之方法，其包含向個體投與治療有效量之：(a)低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之抗CCR8 mAb，其包含重鏈，該重鏈包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，該輕鏈包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及(b)另一種治療劑，使得個體得到治療，其中癌症係選自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合區癌症及子宮頸癌，且其中其他治療劑為抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 Ab。

【0258】 在某些其他實施例中，本發明亦提供一種用於治療罹患癌症之個體之方法，其包含向個體投與治療有效量之：(a)低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之抗CCR8 mAb，其包含重鏈，該重鏈包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，該輕鏈包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及(b)另一種治療劑，使得個體得到治療，其中癌症係選自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合區癌症及子宮頸癌，其中該其他治療劑為尼沃單抗，且其中以每2週一次1-30 mg之劑量向個體投與抗CCR8 Ab且以每2週一次240 mg或每4週一次480 mg之劑量向個體投與尼沃單抗。

【0259】 本發明亦提供一種用於抑制個體中之腫瘤細胞之生長之方

法，其包含向個體投與治療有效量之低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之抗CCR8 mAb，該mAb包含重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸，使得抑制個體中之腫瘤細胞之生長，其中癌症係選自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合區癌症及子宮頸癌。

【0260】 在某些實施例中，本發明亦提供一種用於抑制個體中之腫瘤細胞之生長之方法，其包含向個體投與治療有效量之：(a)低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之抗CCR8 mAb，其包含重鏈，該重鏈包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，該輕鏈包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及(b)另一種治療劑，使得抑制個體中之腫瘤細胞之生長，其中癌症係選自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合區癌症及子宮頸癌，且其中其他治療劑為抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 Ab。

【0261】 在某些其他實施例中，本發明亦提供一種用於抑制個體中之腫瘤細胞之生長之方法，其包含向個體投與治療有效量之：(a)低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之抗CCR8 mAb，其包含重鏈，該重鏈包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，該輕鏈包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及(b)另一種治療劑，使得抑制個體中之腫瘤細胞之生長，其中癌症係選自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合區癌症及子宮頸癌，其中該其他治療劑為尼沃單抗，且其中以每2週一次1-30 mg之劑量向個體投與抗CCR8 Ab且以每2週一次240 mg或每4週一次480 mg之劑量向個體投與尼沃單抗。

【0262】

套組

本發明之範疇亦包括包含抗CCR8 Ab之套組。套組通常包括指示套組之內含物之預期用途的標籤及使用說明書。術語標籤包括在套組上或與套組一起提供或以其他方式伴隨套組之任何書面或記錄材料。因此，本發明提供一種用於治療罹患癌症之個體之套組，該套組包含：(a)在約0.01至約20毫克/公斤體重範圍內之一或多個劑量(例如，約0.1或1 mg/kg，或約0.1至約2,000 mg固定劑量，例如約3、10、30或100 mg)之Ab，例如mAb，或其抗原結合部分，其特異性結合於CCR8且介導藉由ADCC進行之CCR8表現細胞之消耗；(b)視情況地，在約0.1至約20毫克/公斤體重範圍內之一或多個劑量(例如，約2至約10 mg/kg，或約200至約1600 mg固定劑量，例如約240或480 mg)之Ab，例如mAb，或其抗原結合部分，其特異性結合於PD-1、PD-L1或CTLA-4；及(c)在本文中所揭示之治療方法中之任一者中使用特異性結合於CCR8之Ab或其部分且視情況地，特異性結合於PD-1、PD-L1或CTLA-4之Ab或其部分之說明。

【0263】 本發明進一步提供用於治療罹患癌症之個體之套組，該套組包含：(a)在約0.01至約20毫克/公斤體重範圍內之一或多個劑量(例如，約0.1或1 mg/kg，或約0.1至約2,000 mg固定劑量，例如約3、10、30或100 mg)之Ab，例如mAb，或其抗原結合部分，其特異性結合於CCR8且介導藉由ADCC進行之CCR8表現細胞之消耗；(b)約0.1至約20毫克/公斤體重之一或多個劑量(例如，約2或3 mg/kg，或200至約1600 mg固定劑量，例如約240或480 mg)之抗PD-1/抗PD-L1 mAb或其抗原結合部分；及(c)在本文中所揭示之組合療法方法中之任一者中使用抗CCR8 mAb及抗

PD-1/抗PD-L1 mAb之說明。

【0264】 在某些實施例中，代替基於體重之劑量，套組包含在約0.1至約2,000 mg範圍內之一或多個固定劑量之抗CCR8 Ab，較佳約0.3至約1,000 mg，諸如約0.3、1、3、5、10、30、60、100、150、200、240、300、400、500、600、800或1,000 mg Ab或其抗原結合部分。在某些實施例中，套組包含0.3、1、3、10、30、100、300及800 mg抗CCR8 Ab以用於每2週一次投藥。在某些其他實施例中，套組包含約100至約600 mg抗PD-1/PD-L1 Ab，例如包含240 mg尼沃單抗以用於每2週一次投藥或480 mg尼沃單抗以用於每4週一次投藥。在某些較佳實施例中，抗CCR8 Ab為mAb 4A19。在其他較佳實施例中，抗CCR8 Ab為mAb 14S15或14S15h。在某些較佳實施例中，抗PD-1 Ab為尼沃單抗。在其他較佳實施例中，抗PD-1 Ab為派立珠單抗。

【0265】 在某些實施例中，Ab可以單位劑型形式共同封裝。在用於治療人類患者之某些較佳實施例中，套組包含本文中所揭示之抗人類PD-1 Ab，例如尼沃單抗或派立珠單抗。

【0266】 藉由以下實例進一步說明本發明，該等實例不應視為進一步限制。在整個本申請案中所引用之所有參考文獻之內容以引用之方式明確併入本文中。

【0267】

實例1

腫瘤Treg中之CCR8表現與FOXP3表現之相關性

CCR8為Treg選擇性標記物

將來自非造血性來源之腫瘤之TCGA樣品(Goldman等人, 2019；

Wang及Liu, 2019；來自UCSC Xena PanCan Repository之經批次校正之FPKM值)分成各腫瘤類別(TCGA名稱，僅腫瘤)且將各轉錄物之RNA-seq資料轉換成腫瘤類型內之標準分佈(平均值=0，標準差=1)，隨後組合所有腫瘤RNA資料。由對數變換之轉錄物之皮爾森相關矩陣(Pearson correlation matrix)進行相互等級(Mutual-Rank)距離量測(Siemers等人, 2017；Huttenhower等人, 2007)。

【0268】 圖1A中展示之跨越所有非血基質tcga腫瘤之基因-基因相關性之基於相互等級之網狀圖將CCR8鑑別為Treg選擇性標記物，因為當與來自TCGA之大部分癌症類型中之其他基因相鄰者相比時，CCR8之轉錄物豐度呈現與*FOXP3*之強及選擇性相關性。值得注意的是，共刺激性/共抑制性分子(CTLA4、ICOS、TIGIT)相對於FOXP3及標準T細胞標記物(例如，CD3E、IL2RB、SLAMF1)佔據網狀圖之中間部分。線權重及距離指示相互等級相關性之強度。

【0269】

CCR8在肝細胞癌瘤中之FOXP3^{hlgh}淋巴細胞上選擇性表現

將資料以對數縮放形式標繪為log2(計數+1)(Zheng等人 (2017), NCBI Gene Expression Omnibus: GSE98638)，且用Fauxflow R/Shiny套件(https://github.com/NathanSiemers/FauxFlow)建立曲線。向各點添加少量高斯雜訊(Gaussian noise)以幫助觀測。

【0270】 如圖1B中所示，CCR8選擇性表現於肝細胞癌瘤腫瘤樣品中之FOXP3^{high}淋巴細胞上，且FOXP3^{mid} CD8及CD4群體中不存在CCR8表現。

【0271】

CCR8表現與其他基因之表現之相關性

在FOXP3$^+$ (表現≥1)T淋巴細胞(表現≥1)中進行CCR8表現≥1與CCR8表現＜1之間的斯皮爾曼相關性分析(Spearman correlation analysis)，且相對於相關標記物之平均基因表現之比率標繪未經調節之斯皮爾曼P值。

【0272】 圖1C展示Zheng等人 (2017)中的轉錄物與FOXP3$^+$細胞內之與CCR8陽性及陰性相關聯。CCR8表現與較高的FOXP3表現量及Treg之標準標記物(IL2RA、IKZF2、BATF)含量相關聯，而較低的CCR8表現與細胞毒性T細胞標記物(GZMA、CD8A)相關聯。

【0273】

實例2

組織處理

人類腫瘤解離

用實驗室解剖剪將腫瘤樣品切碎且用杜恩斯均質器(Dounce homogenizer)以機械方式進一步解離或using人類腫瘤解離套組(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)及gentleMACS解離器(Miltenyi Biotec)根據製造商說明書以酶促方式消化。細胞懸浮液經由70 pM細胞濾器過濾。

【0274】

人類Treg分離及刺激

使用Ficoll密度梯度(GE Healthcare)自leukopak (AllCells)分離PBMC。使用抗CD25微珠粒II (Miltenyi Biotec)以磁性方式富集CD25$^+$細胞。將經富集之細胞針對CD25 (4E3，Miltenyi Biotec)、CD127 (A019D5，BioLegend)、CD45RA (HI100，BioLegend)及CD4 (SK3，BD Biosciences)染色。用BD FACSAria II對CD4$^+$ CD127$_{low}$ CD25$_{high}$

CD45RA$^+$ Treg進行分選。在具有10%胎牛血清(FBS；GE Healthcare, Chicago, IL)之洛斯維帕克紀念研究所(Roswell Park Memorial Institute；RPMI)細胞培養基(Corning, Corning, NY)中，使用Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific)(每1個Treg使用3個珠粒)擴增經分離之原生Treg。在3天之後，以300 U/ml添加IL-2 (PeproTech)。將Treg擴增及冷凍保存。在具有10% FBS及100 U/ml之IL-2之RPMI培養基中，使用CD3/CD28 Dynabeads (每1個Treg使用1個珠粒)再刺激經解凍之Treg。

【0275】

人類皮膚處理

使用完全皮膚解離套組(Miltenyi Biotec)在不存在酶P之情況下，在MACS C試管(Miltenyi Biotec)中將來自正常女性腹部人類皮膚(年齡為43歲)之皮膚活檢物消化隔夜。將細胞懸浮液洗滌、過濾及染色。

【0276】

小鼠組織處理

將腫瘤切碎且接著使用250 U/ml之膠原蛋白酶IV (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ)及DNase I (MilliporeSigma, Burlington, MA)在37℃下以酶促方式消化30分鐘。將經除毛之皮膚切碎且接著用500 μg/ml之膠原蛋白酶XI (MilliporeSigma)、500 μg/ml之玻尿酸酶(MilliporeSigma)及100 μg/ml之DNase I在37℃下以酶促方式消化60分鐘。使用gentleMACS解離器(Miltenyi Biotec)以機械方式解離脾及胸腺。經解離之脾及血液樣品中之紅血球(RBC)用氯化銨鉀溶液(Thermo Fisher Scientific)溶解5分鐘。

【0277】

研究批准

經由商業供應商(BioIVT, Westbury, NY；MT Group, Avaden, BioOptions, Discovery Life Sciences, Los Osos, CA；AllCells, Alameda, CA)或聯合人類組織樣品庫(Cooperative Human Tissue Network；CHTN)收集人類腫瘤、皮膚、脾、患者血液及健康血液白細胞層樣品。在美國，在IRB認可之研究場所自提交書面知情同意書之供體收集所有樣品。

【0278】 由Bristol Myers Squibb (BMS)職業健康部門按照所有相關倫理法規提供之血液供給計劃獲得來自健康供體之血液。所有動物實驗遵從機構指南且由BMS之IACUC根據協議161201批准。

【0279】

實例3

CCR8標記在人類腫瘤中具有低促炎性潛力之抑制性FOXP3$^+$細胞

藉由流式細胞測量術來比較若干Treg相關分子之表現概況。

【0280】

流式細胞測量術

對於流式細胞測量術，通常，用胺反應性活力染料將細胞懸浮液染色。接著，用大鼠、小鼠及人類A/B血清(GEMCELL™；Gemini Bio, West Sacramento, CA)、HUMAN TRUSTAIN FcX™ (BioLegend)及TRUE-STAIN MONOCYTE BLOCKER™ (BioLegend)阻斷人類細胞。用FcR阻斷劑(Miltenyi Biotec)阻斷小鼠細胞。對細胞進行表面染色，且使用製造商方案使用FOXP3轉錄因子染色緩衝液集合(Thermo Fisher Scientific)進行細胞內染色。對於未結合之mAb之結合，使用適當的二級Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories)。使用BD LSRFortessa X-20獲取樣品且使用FlowJo (BD Biosciences)進行分析。流式細胞測量術Ab之完整清單提供於表2中。

【0281】 表2：用於流動式細胞測量術分析之Ab

目標	物種	純系	螢光團	製造商
CD45	人類	HI10	AF488	Biolegend
CCR4	人類	L291H4	PE	Biolegend
CCR4	人類	L291H4	BV510	Biolegend
CD16	人類	3G8	AF647	Biolegend
CD8a	人類	SK1	PerCP-eFluor 710	Thermo Fisher
CD56	人類	CMSSB	PE-eFluor 610	Thermo Fisher
FOXP3	人類	236A/E7	PE-Cy7	Thermo Fisher
CCR8	人類	433H	BV421	BD Biosciences
CD15	人類	W6D3	BV510	BD Biosciences
CD4	人類	SK3	BV650	BD Biosciences
CD4	人類	SK3	BV605	BD Biosciences
CTLA4	人類	BNI3	BV421	BD Biosciences
HLA-DR	人類	G46-6	BUV395	BD Biosciences
PD-1	人類	EH12.1	BUV737	BD Biosciences
CD3	人類	UCHT1	BUV805	BD Biosciences
CD3	人類	UCHT1	APC	BD Biosciences
CD39	人類	A1	BV786	Biolegend
顆粒酶B	人類	QA16A02	PE	Biolegend
IFNg	人類	4S.B3	PE-eFluor 610	Thermo Fisher
IL-1R2	人類	MA5-23626	APC	Thermo Fisher
IL-2	人類	MQ1-17H12	BUV737	BD Biosciences
CD19	人類	SJ25C1	BV510	BD Biosciences
CD25	人類	2A3	APC-R700	BD Biosciences
CD3e	小鼠	145-2C11	BV421	Biolegend
CCR8	小鼠	SA214G2	AF647	Biolegend
CCR8	小鼠	SA214G2	PE	Biolegend
IFNg	小鼠	XMG1.2	PE-Cy7	Biolegend
TNFa	小鼠	MP6-XT22	APC	Biolegend
FOXP3	小鼠	FJK-16a	PE-eFluor 610	Thermo Fisher
CD8a	小鼠	53-6.7	BUV805	BD Biosciences
CD8b	小鼠	H35-17.2	BV650	BD Biosciences
CD4	小鼠	RM4-4	BV786	BD Biosciences
CD4	小鼠	RM4-5	BV786	BD Biosciences
CD45	小鼠	30-F11	BUV395	BD Biosciences
CD90.1	小鼠	OX-7	BB700	BD Biosciences
CD90.2	小鼠	30-H12	BV421	Biolegend
CD45.2	小鼠	104	APC	Biolegend
CD45.1	小鼠	A20	BUV395	BD Biosciences
可固定的活力染料575V	NA	NA	NA	BD Biosciences

【0282】

CCR8為腫瘤相關Treg之標記物

CCR8大量表現於自實體腫瘤手術切除物分離之FOXP3$^+$ Treg上，但在來自患者匹配血液之Treg上的表現顯著較低。相比之下，CCR4、CTLA-4及CD25由來自腫瘤及血液之Treg以類似頻率表現(圖2A)。與周邊血液Treg相比，腫瘤Treg上的FOXP3$^+$ Treg上之CCR8之以每個細胞計之豐度較高(圖2B)，而與周邊血液Treg相比，腫瘤Treg中之CCR4表現較低。在CD4$^+$FOXP3$^-$習知T細胞(CD4$^+$ Tconv)上，CCR8以低於腫瘤及周邊血液中之CCR4及CD25之頻率表現(圖2C及D)。除血液中之CD25以外，血液及腫瘤浸潤性CD8$^+$ T細胞展示所有四種分子之邊緣表現(圖2E及2F)。此等資料表明CCR8為在相對較低的損害抗腫瘤Teff細胞群體之風險下靶向腫瘤Treg之高選擇性標記物。

【0283】

實例4

T淋巴細胞之不同子集上的CCR8之表現

藉由流式細胞測量術來分析與人類腫瘤相關聯之T淋巴細胞之不同子集的CCR8之表現量。以機械或酶促方式解離經切除之人類腫瘤(壺腹部、大腸直腸(CRC)、十二指腸、頭部及頸部、黑素瘤、NSCLC、卵巢、腮腺、腎細胞癌(RCC)、胃、甲狀腺、舌部)。為了比較周邊血液中之Treg及腫瘤浸潤性Treg中之CCR8表現量，使用來自CRC、RCC、黑素瘤及NSCLC患者之經切除之腫瘤。在解離或消化之後，將細胞過濾且針對活力進行染色，接著標記表面標記物，包括用結合於CCR8、CD3、CD4及CD8之藻紅素(PE)結合之Ab (抗hCCR8 Ab純系L263G8；BioLegend)。在

完成表面染色之後，洗滌細胞，接著固定且透性化以用於針對FOXP3之細胞內染色。在洗滌之後，用流式細胞儀處理細胞樣品且使用Flowjo軟體(FlowJo, Ashland, OR)分析資料以計算平均螢光強度(MFI)。Treg定義為$CD3^+CD4^+FOXP3^+$ T細胞，而CD4 Tconv細胞或習知$CD4^+$ T細胞定義為$CD3^+CD4^+FOXP3^-$ T細胞。

【0284】 如圖3A中所示，CCR8由大部分腫瘤駐留Treg表現(中值82%)，如由FOXP3，一種已知的Treg相關轉錄因子定義。相比之下，顯著較小部分之習知腫瘤浸潤性$CD4^+$ T細胞及$CD8^+$ T細胞表現CCR8 (中值分別為12.65%及4.55%)。儘管一小部分CD4 Tconv細胞表現CCR8，但Treg上之以每個細胞計的CCR8之表現量顯著高於CD4 Tconv細胞(中值MFI 2106對比132，$P<0.0001$)，而$CD8^+$ T細胞之CCR8表現量係可忽略的(圖3B)。周邊血液中之Treg亦表現CCR8，但表現量明顯低於在腫瘤浸潤性Treg上發現之表現量(圖3C)。Treg上之CCR8之特異性高表現量使得CCR8成為適於使用抗CCR8 Ab經由ADCC來消耗免疫抑制性細胞群體之目標。

【0285】

實例5

周邊Treg之亞群上的CCR8之表現

為了研究周邊Treg之不同亞群的CCR8之表現量，使用密度梯度自5名健康供體分離PBMC且針對CCR8、CD3、CD4、CD8a、FOXP3 (細胞內)、CCR8及CD45RO染色。將T細胞再分成$CD4^+FOXP3^+$ T細胞(Treg)、$CD4^+FOXP3^-$ T細胞(CD4 Tconv)及CD8 T細胞($CD3^+CD8a^+$)子集。將此等子集進一步分成原生($CD45RO^-CCR7^+$)、效應子記憶(EM；

CD45RO$^+$CCR7$^-$)及中央記憶(CM，CD45RO$^+$CCR7$^+$)群體以進行CCR8表現之檢驗。經由流式細胞儀處理細胞且使用Flowjo軟體進行分析。亦自癌症患者之亞群分離PBMC且針對CCR8表現進行染色，如實例4中關於人類腫瘤浸潤性淋巴細胞所描述。

【0286】結果展示於圖4中。圖4A展示與高百分比之腫瘤浸潤性Treg (中值為82%；參考圖3A)上之表現相比，CCR8表現於一小部分來自健康個體之周邊血液Treg上(中值為21%)。在來自健康個體之Treg群體內，CCR8在效應子記憶群體(EM)中更多地表現且在中心記憶細胞(CM)中之表現程度較低(圖4B)，而在原生Treg (圖4B)或CD4$^+$習知T細胞(圖4C)上觀測到極少的CCR8表現。在CCR8$^+$ Treg群體內，以每個細胞計，與周邊CCR8$^+$ Treg相比，腫瘤相關CCR8$^+$ Treg表現更多的CCR8，如藉由經結合之抗CCR8 Ab之Treg所量測(圖4D)。

【0287】

實例6

抑制性最高之FOXP3^{HIGH} Treg上的CCR8之表現

藉由流式細胞測量術來研究FOXP3$^-$ Treg以及表現中等及大量表現FOXP3之Treg上之CCR8之表現。使用解剖剪及杜恩斯裝置(dounce)以機械方式解離來自2名黑素瘤及1名RCC患者之經切除之人類腫瘤。在解離之後，將細胞過濾且針對活力進行染色，接著用結合於CCR8、CD3、CD4及CD8之Ab標記表面標記物，如實例4中所描述。在完成表面染色之後，洗滌細胞，接著固定且透性化以用於針對FOXP3之細胞內染色。在洗滌之後，用流式細胞儀處理樣品且使用Flowjo軟體分析資料。針對CD3$^+$CD4$^+$群體圈選細胞以用於分析。

【0288】 如圖5中所示，CCR8主要由代表活化程度最高之Treg之$CD4^+FOXP3^{high}$群體表現。在其中存在明顯的$FOXP3^{mid}$群體之樣品中，如在2名黑素瘤患者腫瘤樣品中，在$FOXP3^{high}$ T細胞中發現大部分CCR8表現。$FOXP3^{mid}$群體中之CCR8表現量明顯較低。在一些情況下，大部分患者$FOXP3^+$ T細胞呈現大量FOXP3 (圖5，RCC)。在此等情況下，CCR8表現與FOXP3表現重疊。與可為經活化之習知T細胞或靜止Treg之$FOXP3^{mid}$ $CD4^+$ T細胞形成對比，已證實$FOXP3^{high}CD4^+$ T細胞為真正的Treg。

【0289】

實例7

過表現免疫抑制分子且對促炎性標記物表現不足之$CCR8^+$ Treg

為了研究由腫瘤相關、表現CCR8及CCR4之T細胞進行之免疫抑制性及促炎性蛋白質之表現，使用套組(Miltenyi Biotec)將藉由隔夜遞送自臨床醫師獲得之經切除之肺腫瘤以酶促方式消化成單細胞懸浮液。將經解離之腫瘤細胞懸浮液在含有10% FBS之RPMI培養基(Corning)中靜置隔夜。在第二天，細胞在存在(用於細胞刺激)或不存在佛波醇豆蔻酸乙酸(PMA)及離子黴素之情況下，在添加布雷非德菌素A (brefeldin A；BFA)及莫能菌素(monensin)(ThermoFisher, Waltham, MA)之情況下在37℃下培養4小時，以阻斷蛋白質之運輸。在4小時培養之後，針對與Treg抑制及炎症相關聯之表面及細胞內標記物將細胞染色且藉由流式細胞測量術進行分析。

【0290】 圖6A-D展示患者腫瘤中之$CCR8^+$ Treg富含免疫抑制性分子，而在$CCR4^+$ T細胞中未發現類似的富集(圖7A-D)。在$CCR8^+$部分中發現大部分(約80%)$CD25^+$細胞，而在$CCR8^-$部分中發現小於20%之$CD25^+$

細胞(圖6A)。類似地，在CCR8$^+$部分中發現幾乎所有CD39+細胞，而小於40%之表現此標記物之細胞為CCR8$^-$細胞(圖6B)。約三分之一的表現IL1R2之細胞為CCR8$^+$細胞，但未在CCR8$^-$部分中發現IL1R2表現細胞(圖6C)，且當在經刺激之T細胞中量測時，CCR8$^+$與CCR8$^-$ T細胞中之IL1R2表現之間的差異甚至更大(圖6D)。因此，就免疫抑制而言，來自患者腫瘤樣品之CCR8$^+$ T細胞富含若干種具有抑制功能之蛋白質，諸如CD25、CD39及IL1R2。CD39為一種外核苷酸酶，其將ATP轉化成AMP且接著轉化成腺苷，該腺苷對T細胞具有抑制性(Cekic等人, 2011)，而CD25 (由Treg用於螯合IL-2之IL-2受體)及IL1R2 (IL-1之誘餌受體)分別潛在地充當促炎性細胞介素IL-2 (Pandiyan等人, 2012)及IL-1D/E (Garlanda等人, 2013)之儲集器。

【0291】 與CCR8$^+$或CCR8$^-$型T細胞形成對比，CCR4$^+$及CCR4$^-$ T細胞中之CD25 (圖7A)、CD39 (圖7B)及IL1R2 (圖7C及7D)之表現量之差異較小。因此，所靶向之CCR8$^+$細胞之消耗將移除表現CD25、CD39及IL1R2之免疫抑制性Treg，而靶向CCR4之消耗將留下表現此等分子之Treg。

【0292】 使用HLA-DR作為活化標記物，CCR8表現亦與高HLA-DR表現量相關(圖8A)且因此鑑別經活化之Treg，而CCR4表現並非如此(圖8B)。

【0293】 用PMA及離子黴素離體刺激以酶促方式解離之患者腫瘤培養物表明，CD4$^+$ T細胞之CCR8$^-$部分含有絕大部分的產生IFNγ (圖9A)、IL-2 (圖9B)及顆粒酶B (圖9C)之細胞。相比之下，在此分析法中，CCR4$^+$CD4$^+$ T細胞為IFNγ (圖10A)及IL-2 (圖10B)之主要生產者，表明所

靶向之表現CCR4但不表現CCR8之細胞之消耗可能對抗腫瘤免疫不利。$CCR4^+$及$CCR4^-$ T細胞產生類似量之顆粒酶B (圖10C)。

【0294】

實例8

產生針對CCR8之MAb

抗hCCR8 mAb

藉由用各種人類CCR8 (hCCR8)抗原對不同嚙齒動物進行免疫接種來產生人類化、嵌合或人類抗CCR8 mAb，該等嚙齒動物包括普通C57Bl/6小鼠、表現人類Ig譜系之轉基因小鼠之不同品系以及具有CCR8基因剔除之特異性產生之小鼠品系。接著，將所選擇的非轉基因小鼠中產生之Ab轉化成人類化或嵌合Ab。

【0295】

用CCR8抗原進行免疫接種

為了產生針對hCCR8之Ab，用hCCR8抗原對2-5隻嚙齒動物之群組進行免疫接種，其中各群組經歷包含CCR8抗原、劑量、注射途徑、佐劑、動物品系、動物年齡及免疫接種時序之獨特組合之免疫接種策略。對58個群組中之總共222隻動物進行免疫接種。對同型接合CCR8基因剔除小鼠(來源於C57BL/6)、5種不同品系之人類Ig轉基因小鼠、野生型小鼠(BALB/C、C57BL/6)及亞美尼亞倉鼠(Armenian hamster)進行免疫接種。

【0296】 用廣泛多種抗原進行免疫接種，該等抗原包含17種含有完全或部分hCCR8蛋白質序列之抗原組合物中之一或多者。通常，用2-5×10^6個過表現CCR8之細胞(經轉染或轉導之HEK 293F、BA/F3或CHO穩

定細胞株)、經由差速離心自此等細胞分離之富含質膜之部分、來源於暫時過表現hCCR8之293細胞的經清潔劑溶解之脂質穩定化CCR8蛋白質(蛋白脂質體、雙層膜微胞、微胞)或具有用於增強之穩定性的CCR8跨膜突變之細胞株(Abilita Bio, San Diego, CA)，經由腳掌或尾根對小鼠進行免疫接種至多12次。經由腹膜內及皮下注射來遞送用細胞及質膜部分進行之類似免疫接種。

【0297】 在許多情況下，使用3-10 μg具有對應於hCCR8之N端序列的兩個磺基酪胺酸殘基之匙孔螺血氰蛋白(KLH)結合之35個殘基型肽作為抗原。在一些情況下，在10次免疫接種計劃表中，此N端肽係在第3、第5及第7次給藥時與hCCR8 293F細胞一起提供，從而增強針對CCR8 N端之Ab反應且使其成熟，因為結合於此肽序列之Ab與下游分析法中之功效相關聯。在其他情況下，此N端肽係與每次細胞或質膜部分免疫接種組合提供，或在不提供其他抗原之情況下單獨提供。

【0298】 在一些情況下，用編碼CCR8之DNA質體經由脛骨前肌及四頭肌之肌肉內注射對小鼠進行免疫接種，接著進行先前所描述之細胞或N端肽免疫接種。亦使用模擬CCR8之第二細胞外循環之限制性肽、具有CCR8之病毒樣顆粒及其他以重組方式經工程改造之CCR8材料(脂蛋白元，及具有增強之穩定性之CCR8跨膜突變之細胞株)。將一些基於細胞及質膜之抗原使用苦味基磺酸(Sigma-Aldrich)進行半抗原標記以提高免疫原性。在一些情況下，在免疫接種期間交替提供hCCR8及食蟹獼猴CCR8(cCCR8)抗原。通常將含有單磷醯基脂質A之RIBI佐劑(Sigma-Aldrich)與免疫接種一起遞送，以與抗原之1:1混合形式或以相鄰注射形式遞送以免破壞脂質雙層及CCR8蛋白質構形。動物在18與177天之間的不同週期內

接受免疫接種。

【0299】為了監測免疫反應，通常在免疫接種之後4-6週，如下文所描述藉由流式細胞測量術及ELISA來篩選來自眶後或尾部血之經滴定之血清。針對結合於多種過表現CCR8之細胞株、未過表現CCR8之相應的陰性對照細胞株及與牛血清白蛋白(BSA)結合之CCR8之硫酸化N端肽之Ab來篩選血清。量測每隻動物中之CCR8特異性及CCR8非特異性Ab反應，且選擇具有足夠的抗CCR8 Ig效價之動物進行最終免疫接種，接著在6及3天後處死且收集組織以產生融合瘤融合物。與其他小鼠品系相比，在CCR8基因剔除小鼠中觀測到優良的CCR8特異性Ab效價，且對大鼠及倉鼠進行免疫接種之有限成果亦未產生任何Ab。與KLH載體蛋白結合之CCR8之硫酸化N端肽為最佳免疫原之一，且單獨或最佳與質膜部分組合起作用。相反，並非所有抗原皆起作用；舉例而言，使用脂蛋白元及膜突變型細胞株作為免疫原未產生任何Ab。

【0300】

產生針對CCR8之MAb的融合瘤之產生

自如上文所描述進行免疫接種之小鼠分離淋巴器官，包括脾及淋巴結。最典型地，自用CCR8免疫原經由腳掌及尾根進行免疫接種之小鼠收集腘、腹股溝及胯淋巴結。藉由使用細胞融合電致孔器(BTX, Holliston, MA)之基於電場之電融合，藉由與來源於P3X63AgU.1細胞株(ATCC CRL-1597)之永生化小鼠骨髓瘤細胞進行融合來產生融合瘤。將所得細胞在補充有胺基喋呤(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)之培養基E (StemCell Technologies, Cambridge, MA)中塗佈於平底微量滴定盤中以進行融合瘤之選擇。

【0301】

抗mCCR8 mAb

藉由將編碼可變區之DNA選殖至兩種不同的pTT5載體(加拿大國家研究委員會(National Research Council of Canada))中且使用Expi293表現系統表現來將可商購的大鼠IgG2b抗mCCR8 mAb (純系SA214G2；BioLegend)之同型變成mIgG2a或mIgG1-D265A。

【0302】

實例9

抗人類CCR8 MAb之篩選及選擇

篩選選擇性結合於人類CCR8之MAb

為了產生結合於hCCR8之mAb，用各種hCCR8抗原對嚙齒動物(包括人類Ig轉基因小鼠)進行免疫接種且如實例8中所描述產生融合瘤。在歷時10-13天之培養及更換生長培養基之後，自個別孔收集融合瘤培養物上清液且進行篩選以鑑別具有經分泌之CCR8特異性Ab之孔。最初針對至少兩種細胞株(一種過表現hCCR8之細胞株及不過表現CCR8之相應的對照性細胞株)篩選所有上清液。經由基於影像之螢光微量分析法技術(FMAT)篩選、使用Intellicyt iQue Screener (Sartorius, Albuquerque, NM)之高通量384孔流式細胞測量術或基於黏附細胞之酶聯結免疫分析法(ELISA)來量測細胞上之Ab結合。有時同時進行初始結合分析法以最大化CCR8 Ab之鑑別。針對hCCR8 Ab篩選66種融合瘤融合物中之來自約157,250個培養物孔之上清液。

【0303】 將來自陽性孔之融合瘤與新的培養基一起轉移至24孔盤中，使其生長2-3天，接著再次藉由流式細胞測量術進行篩選以確認結合

於CCR8之Ab。簡言之，將75-100 μl融合瘤培養物上清液及過表現CCR8之細胞(諸如CHO或293F)或對照性細胞(諸如GFP-CHO或親本293F)共同培育30-60分鐘，洗滌且與結合於AF647、APC或PE之抗小鼠IgG Fc或抗人類IgG Fc二級Ab (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)一起培育。在培育及洗滌之後，藉由流式細胞測量術來量測螢光。鑑別約328種融合瘤純系產生抗hCCR8 Ab，亦即，此等純系為在融合之後約2週獲得之FACS+融合瘤上清液且包括低親和力結合劑，該等結合劑在針對與表現CCR8之細胞株而非對照性細胞株之結合的初始篩選中展示結合。出於各種原因，高級Ab中存在高損耗率，例如當不可分離產生抗CCR8之細胞、某些純系在CD16交聯或Treg消耗分析法中之效果不佳、一些純系中之Ab產率低至不可接受之程度及某些Ab含有不可規避之序列可靠性時，發生純系損失。在328種FAC+純系中，約90種未廣泛篩選且在其餘純系中，約55種進行至被選殖至人類主鏈中以進行詳細測試之階段。約15%的此等Ab (包括mAb 4A19、14S15、18Y12、16B13、10R3及8D55)基於其在各種功能性分析法中之效能而被視為良好的治療性候選物(參見例如，實例11、14、15、17、19-23及25-29)。因此，本文中描述為介導CCR8表現細胞之消耗的Ab之Ab包括mAb 4A19、14S15、14S15h、18Y12、16B13、10R3及8D55。

【0304】為了將確定的抗CCR8特異性Ab之抗原決定基大體上分類，亦藉由ELISA來篩選培養物上清液以量測與CCR8 N端肽之結合。簡言之，在4℃下，將代表硫酸化hCCR8 N端之BSA結合之肽(2 μg/ml)塗佈於高結合型96孔板(Corning)上隔夜。將盤用BSA阻斷且洗滌，接著在盤振盪器上經30-60分鐘添加100 μl培養物上清液。在洗滌之後，添加適當

的與辣根過氧化酶(HRP)結合之抗Fc二級Ab，且用ABTS或HRP受質(SurModics, Eden Prairie, MN)培育盤且用Sunrise微板讀取器(TECAN；Männedorf, Switzerland)在405或650 nm下量測吸光度。藉由ELISA發現，所產生之針對hCCR8之Ab主要(但非排他地)與BSA結合之具有兩個硫酸化酪胺酸殘基之N端肽序列結合。在此等Ab中，結合於替代性BSA結合之僅含有一個硫酸化酪胺酸之N端肽之ELISA通常顯著降低，結合通常在酪胺酸殘基皆未硫酸化時喪失。

【0305】 將分泌抗CCR8 Ab之融合瘤次選殖一次或兩次以確保單純系性。簡言之，在5 ml半固體甲基纖維素培養基(StemCell Technologies)中將約700個活融合瘤細胞與用於偵測融合瘤分泌之IgG的AF488結合之抗人類或抗小鼠IgG Ab (Jackson ImmunoResearch)一起塗佈。在7天之後，將由單細胞產生之具有理想特性(與其他群落之距離、IgG分泌量、群落大小及群落圓度，如藉由ClonePix2系統(Molecular Devices, San Jose,CA)所量測)之融合瘤收集至96孔盤培養物中且使其生長2-4天。如先前所描述藉由流式細胞測量術來篩選培養物上清液以確認CCR8 Ab結合。活體外培養穩定的融合瘤次純系以產生用於親和純化及進一步表徵之Ab。藉由標準定序技術(桑格定序(Sanger sequencing)及下一代定序(next generation sequencing))獲得編碼Ab重鏈及輕鏈之DNA序列。比較由Ab胺基酸序列預測之質量與經由質譜獲得之已知的經純化之Ab質量以確保定序準確性。

【0306】 總體而言，在篩選所產生之Ab時，如上文所描述之與CCR8之結合且更重要的是，CD16交聯(實例17)為用於早期篩選以測定哪些Ab展示作為治療性Ab之前景以進一步表徵之兩種主要分析法。對針對

過表現hCCR8之293F細胞之Ab之結合滴定(實例11)通常區分強結合物與弱結合物，且弱結合物通常在功能性分析法中之效果較差且因此通常不進行至下一篩選階段，因此其未包括於該下一步驟中之漏斗中。在此等分析法中具有良好或中等結合或活性之Ab進行至關於原發性Treg之類似分析法，例如結合(實例11)、鈣通量(實例15)及NK介導之ADCC (實例19)，其中認為NK介導之ADCC為用於比較Ab有效性及選擇引導候選物之最重要的性質之一。因為其受原生細胞限制，因此使用基於細胞株之CD16交聯分析法作為ADCC替代性分析法，其通常與Treg ADCC/消耗分析法之結果良好相關(實例19、20及22)。

【0307】 在原發性Treg ADCC分析法中，對於某些Ab，認為Ymax (磷脂結合蛋白V+細胞百分比)與EC_{50}值同樣重要(若未比EC_{50}值更重要)。認為具有最高ADCC Ymax (在特異性結合時)之Ab優於具有類似的EC_{50}但較低的Ymax之Ab。

【0308】

實例10

小鼠抗CCR8 MAb之人類化

將小鼠抗CCR8 MAb人類化成4A19 MAb

對小鼠抗hCCR8 mAb進行工程改造以將構架人類化成最近似的人類生殖系序列(對於重鏈，其為hIgHV1-8*01及hIGJ4，且對於輕鏈，其為IGKV2D-30及hIGKJ2)。移除若干潛在序列可靠性。使重鏈CDR1中之單一不成對的半胱胺酸突變成絲胺酸(C35S)。藉由使天冬胺酸突變成麩醯胺酸(D52Q)來移除Asp-Gly序列模體處之潛在異構化位點。嘗試此位點處之四種其他突變(D52E、D52S、D52V、D52A)且基於以高親和力結合表現

CCR8之Raji細胞株之能力來選擇最佳變異體，即D52Q。藉由用天冬胺酸置換天冬醯胺(N72D)來移除重鏈可變域之構架中之潛在醣基化位點。基於以27%之出現率存在於生殖系中之天冬胺酸來選擇此突變。用苯丙胺酸(V27F)置換輕鏈之CDR1中之纈胺酸且產生具有增加之結合之分子。所得mAb，即4A19，展示與親本9D7 Ab類似的與表現CCR8之Raji細胞之結合(對於9D7及4A19，分別為10 nM對比3 nM)。

【0309】 表3. 代表性抗hCCR8 MAb之功能性表徵資料

mAb	mAb之類型	免疫原
4A19	未經岩藻醣基化之人類化IgG1抗hCCR8	hCCR8 293F細胞(在3次免疫接種中，+KLH hCCR8-N-Sulf肽)，來自In-Cell-Art (Nantes, France)之編碼hCCR8之DNA
14S15[a]	未經岩藻醣基化之嵌合小鼠-人類[b]抗hCCR8	其產生不可偵測之抗CCR8血清效價，接著為KLH hCCR8-N-Sulf肽
18Y12	未經岩藻醣基化之嵌合小鼠-人類[b]抗hCCR8	KLH hCCR8-N-Sulf肽
16B13	未經岩藻醣基化之人類IgG1	hCCR8 BAF3質膜+KLH hCCR8-N-Sulf肽
2M18	人類IgG1抗hCCR8	hCCR8 BAF3質膜+KLH hCCR8-N-Sulf肽
15C17	人類IgG1抗hCCR8	CCR8 293質膜+KLH/BSA N-sulf-hCCR8肽
13T20	人類IgG1抗hCCR8	CCR8 293質膜+KLH/BSA N-sulf-hCCR8肽
10R3	人類IgG1抗hCCR8	hCCR8 BAF3質膜+KLH hCCR8-N-Sulf肽
8D55	人類IgG1抗hCCR8	hCCR8 BAF3質膜+KLH hCCR8-N-Sulf肽
1V11	人類IgG1抗hCCR8	hCCR8 BAF3質膜+KLH hCCR8-N-Sulf肽
11K16	人類IgG1抗hCCR8	hCCR8 BAF3質膜+KLH hCCR8-N-Sulf肽
12F27	未經岩藻醣基化之嵌合物[c] (mFc/hFab)	hCCR8 293質膜+KLH hCCR8-N-Sulf肽

[a] 本文中稱為14S15之mAb係指小鼠抗hCCR8 mAb之嵌合衍生物，其中小鼠Fc區由nf IgG1人類Fc置換。在此實例中，如下文所描述產生此mAb之人類化、親和力成熟及序列可靠性固定版本且稱為14S15h。

[b] 此等mAb為包含移植至人類Fc上之小鼠Fab之嵌合Ab。

[c] 在相對含義上，此mAb為嵌合Ab，因為其係在轉基因小鼠中產生以包含小鼠Fc及完全人類Fab。此等小鼠經如此設計以產生包含用於幫助親和力成熟之小鼠Fc之Ab。

【0310】 所產生之抗CCR8 mAb之代表性數目列舉於表3中，其指示mAb之類型及用於產生其之免疫原。使用Expi293表現系統(Thermo Fisher Scientific)，與hIgG1同型相同地以重組方式產生人類抗hCCR8 Ab。在Expi293 Fut8$^{-/-}$細胞中表現Nf (hIgG1-nf)Ab。

【0311】表3中之若干Ab，亦即，mAb 2M18、15C17、13T20、1V11、11K16及12F27為在篩選分析法(例如，CD16交聯及Treg ADCC分析法)中效果不佳之Ab (相對較高之EC_{50}值及相對較低之Ymax值)且因此被視為無前景之治療性候選物。然而，其包括於表3中以強調絕大部分所產生之CCR8結合性Ab未被視為強治療性候選物之事實。

【0312】

將小鼠抗CCR8 MAb人類化成14S15h MAb

對另一種小鼠抗CCR8 mAb進行工程改造以將構架人類化成最近似的人類生殖系序列(對於重鏈，其為hIgHV3-15且對於輕鏈，其為IGKV2-18)。構架之人類化引起人類Fab之結合降低，如藉由SPR所量測(K_D為4.2 nM，相比之下，起始小鼠Ab，即9G10之KD為1.4 nM)。使用3種不同的NNK庫以及用來自Anaspec (Freemont, CA)之200 nM、50 nM、10 nM及1 nM生物素化CCR8 N端肽在增加之洗滌嚴格性下進行之4輪淘選來進行重鏈可變域之親和力成熟。重鏈CDR1區域中之N30G之單取代引起親和力成熟。此外，藉由使asn突變成gln (N28Q，Kabat編號)來移除Asn-Gly序列模體處之潛在去醯胺化位點。所得人類化、親和力成熟之抗體及序列可靠性移除之14S15h具有完全復原且甚至增加之對CCR8 N端肽之親和力(對於14S15h Fab片段，K_D為0.64 nM)。本文中所描述之涉及14S15 mAb之分析法為此mAb之嵌合版本，如表3中所指示。

【0313】

實例11

以高親和力結合於hCCR8表現細胞之抗CCR8 mAb

抗hCCR8 MAbs與Treg之結合之EC_{50}值

將抗hCCR8 mAb與經活化之人類Treg或表現人類CCR8之細胞株(293F、CHO、Raji)一起培育。在存在100單位/毫升之重組人類IL-2之情況下，用抗CD3/CD28活化珠粒(ThermoFisher)刺激由預先經分離及擴增之Treg製備之經活化之Treg2天。自30 μg/ml之起始濃度連續稀釋Ab。應用適當的針對原發性抗CCR8 Ab之PE結合之二級Ab (Jackson ImmunoResearch)，在4℃下培育15分鐘且接著進行洗滌。用流式細胞儀處理樣品且使用Flowjo分析資料且展示於圖11中。使用GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA)計算所選擇的抗CCR8 mAb與經活化之Treg之結合之EC_{50}值。

【0314】 如圖11中所示，所產生之抗CCR8 mAb之代表性樣品呈現以某一範圍內之親和力結合於各種經hCCR8轉染之細胞株及經活化之Treg。通常最初基於Ab對表現CCR8之細胞株(CHO、293F、Raji)之結合親和力來篩選Ab，且發現大部分所篩選之Ab呈現低於1 nM之半最大有效濃度(EC_{50})(圖11A)。然而，當測試此等經預先篩選之Ab與經活化之Treg之結合時，觀測到更廣泛範圍之結合親和力，其中小於一半之Ab呈現以低於1 nM之EC_{50}進行之結合(圖11A)。具有在皮莫耳至奈莫耳範圍內之EC_{50}值的所選擇之Ab之子集呈現於圖11B中，且相應的EC_{50}值提供於表4中。

【0315】 表4. 結合於經活化之Treg之抗CCR8 mAb之親和力(EC_{50})

抗CCR8 MAb	中值EC_{50} (nM)
8D55	0.284
10R3	14.1
14S15	0.252
16B13	0.149
4A19	1.65
18Y12	0.120

【0316】 因為已證實抗hCCR8 mAb (包括18D55、10R3、14S15、

16B13、4A19及18Y12)具有較高的引發ADCC (實例17)或直接引發腫瘤浸潤性Treg之有效消耗(實例19、20及22)之潛力，顯而易見的是，以nM範圍內(例如，約20 nM或更低，但極限可較高，例如超過100 nM)之親和力(EC_{50})結合於經活化之Treg上的CCR8之Ab可有效介導Treg消耗。然而，為了適用作特異性靶向腫瘤浸潤性Treg之治療劑，與CCR8之結合必須為高特異性的(參考mAb 16B13，其以高親和力結合於CCR8，但亦強效結合於非CCR8型目標(實例14))。

【0317】

抗*CCR8 MAb，即4A19，與CCR8 N*端肽之結合之K_D值

藉由表面電漿子共振(SPR)來量測mAb 4A19與人類CCR8之N端肽之結合之解離常數(K_D)。在HBST緩衝液(10 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.05% 1 g/l之BSA)中，在37℃下用Biacore T200進行SPR量測。用EDA (乙二胺)阻斷具有固定之抗人類κ捕獲pAb (Southern Biotech, Birmingham, AL)之CM4晶片。捕獲CCR8 Ab (Fab及mAb)且在100微升/分鐘之流動速率下歷時2分鐘注射CCR8 N10端肽(200 nM、40 nM、8 nM或1.6 nM)作為分析物。所有資料經雙重參考且使用Biacore T200評估軟體版本3.1藉由質量轉移來針對1:1朗格繆爾結合模型(Langmuir binding model)進行擬合。藉由Anaspec (Fremont, CA)產生CCR8殘基1-35未經硫酸化(CCR8-無磺基)、在Tyr15處硫酸化(CCR8-磺基Y15)、僅在Tyr17處硫酸化(CCR8-磺基Y17)或在位置Tyr15及Tyr17處硫酸化(CCR8-2個磺基)之肽。

【0318】 表5. 結合於CCR8 N端之抗CCR8 mAb (4A19)Fab片段之親和力(K_D)

MAb	配位體	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
4A19	CCR8-2個磺基	2.5×10^7	4.1×10^{-2}	1.6×10^{-9}
4A19	CCR8-磺基Y17	4.3×10^6	8.4×10^{-2}	2.0×10^{-8}
4A19	CCR8-磺基Y15	粗略估計：		約1.3×10^{-6}
4A19	CCR8-無磺基	未結合		

【0319】 表5中概述之結果表明4A19 Fab片段以1.6 nM之K_D結合於CCR8 N端。磺基化酪胺酸係結合所需的，因為未經磺基化之肽未展示任何與4A19 Fab片段之結合。Y15上不存在磺基化(CCR8-磺基Y17)引起與經雙重磺基化之肽相比親和力降低約10倍，而Y17上不存在磺基化(CCR8-磺基Y15)引起4A19結合降低約1,000倍(表5)。

【0320】

實例12

結合於CCR8 N端肽之4A19之晶體結構

4A19 Fab與經單硫酸化之肽之結合

使4A19重鏈之Fab區(V_H及C_{H1}域)與8His標籤融合且選殖至pTT5載體中。在HEK細胞中表現包含此經修飾之4A19重鏈及4A19輕鏈之4A19 Fab片段。上清液經鎳親和管柱純化，且將溶離液緩衝液交換至磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中且用含有10 mM Tris pH 7.4、150 NaCl之操作緩衝液在尺寸排阻管柱(GE Superdex-200)上設定尺寸。組合適當的主峰且濃縮至7-10 mg/ml。藉由Bio-Synthesis (Lewisville, TX)以化學方式合成僅Y17經硫酸化之人類CCR8之殘基1-35。將凍乾肽溶解於10 mM Tris pH 7.4、150 mM NaCl中且與4A19 Fab片段以5:1莫耳比混合。藉由混合蛋白質溶液與相同份量之25% PEG3350來進行結晶且使用Al油防凍。在空間群C2中針對2.03 Å之解析度對晶體進行繞射。所收集之資料使用XDS編索引，使用ccp4i進行按比例縮放及捨位且使用refmac5進行優化。

【0321】 圖12A展示在2.03 Å解析度下結合於CCR8 N端肽(以桿狀

圖展示)之4A19 Fab片段之晶體結構(以表面表示方式顯示)，表明由4A19結合之抗原決定基包含CCR8之殘基15-21，該CCR8在其中心處具有硫酸化之酪胺酸-17。

【0322】

4A19 Fab與經雙硫酸化之肽之結合

如先前章節中所描述產生4A19 Fab片段。藉由Anaspec以化學方式合成由具有硫酸化之Y15及Y17的hCCR8之殘基1-35組成之肽。將Fab片段緩衝液交換至50 mM NaCl、10 mM Tris pH 8.0中，且以2倍莫耳過量方式向Fab片段中添加經雙硫酸化之肽。藉由以12.8 mg/ml混合200 nl經濃縮之蛋白質樣品與200 nl母液(0.2 M乙酸銨、20% PEG 3350，pH 7.2)，在20℃下藉由坐滴蒸汽擴散使晶體生長。晶體在7天內出現且用Advanced Photon Source，在光束線17-ID (IMCA-CAT)處在1.80 Å解析度下收集x射線繞射資料。使用XDS在空間群P21中處理資料且用Phaser藉由分子置換來測定結構且用Phenix進行優化。

【0323】 圖12B展示結合於CCR8 N端肽(以桿狀圖展示)之4A19 Fab片段之晶體結構(以表面表示方式顯示)。4A19 Ab識別位置Y15及Y17處之兩個tyr硫酸殘基。使用PISA軟體計算CCR8抗原決定基之分子相互作用。當與4A19 Fab片段複合時，CCR8殘基V12、D14、Y(SO3)15、Y16、Y(SO3)17、P18、I20、F21及S22展示可及表面積之變化＞3A2。

【0324】

實例13

抗mCCR8 MAb與mCCR8表現細胞之結合

抗CCR8-mIgG2a MAb與表現mCCR8之CHO細胞之結合

將抗CCR8-mIgG2a (市售大鼠抗mCCR8 mAb [BioLegend純系SA214G2]之小鼠IgG2a同型，本文中用作本文中所揭示之引發ADCC之抗hCCR8治療性Ab之替代物)自30 μg/ml之起始濃度連續稀釋且與5×10^5個表現mCCR8之CHO細胞一起培育。在培育之後，洗滌細胞且接著在冰上用抗小鼠IgG、PE結合之二級Ab (Jackson ImmunoResearch)染色30分鐘。洗滌細胞且用流式細胞儀進行分析。使用Flowjo計算平均螢光強度。使用GraphPad Prism計算，測定EC_{50}為6.44 nM。此顯著高於以上分析之許多抗hCCR8 Ab之EC_{50} (對於與表現hCCR8之CHO細胞，其為約0.05 nM)。

【0325】

抗CCR8 MAb與小鼠胸腺細胞及原發性經活化之小鼠脾Treg之結合

藉由流式細胞測量術來分析抗CCR8-mIgG2a與小鼠胸腺細胞及來自小鼠脾細胞之原發性經活化之Treg之結合。胸腺T細胞組成性表現CCR8，而在脾Treg上誘導CCR8表現。為了在小鼠脾細胞上誘導CCR8表現，分離$CD4^+$ T細胞且用抗CD3/CD28珠粒(3:1比率)及2,000 U/ml之重組小鼠重組IL-2 (rIL-2)活化。將在同一天分離之胸腺$CD4^+$ T細胞或活化48小時之$CD4^+$脾T細胞與抗CCR8-mIgG2a或抗KLH-mIgG2a對照性Ab之滴定物混合。藉由經螢光標記之抗小鼠IgG Ab偵測Ab與細胞表面CCR8之結合。以螢光方式結合之二級Ab之總CD4細胞陽性率方式量測相對細胞結合。

【0326】 證實抗mCCR8 Ab結合於胸腺$CD4^+$細胞(EC_{50}=4 nM)及經活化之小鼠脾$CD4^+$細胞(EC_{50}=6.16 nM)之表面上之CCR8。

【0327】

實例14

不同抗hCCR8 MAb之組織交叉反應

在1及3 μg/ml下測試抗hCCR8 mAb (18Y12、16B13及4A19)與表現CCR8之細胞株、PBMC及不同組織類型之結合(對於各測試物，n=1-2)。

【0328】

CCR8轉染物

所有3種Ab皆強效結合於經hCCR8轉染之CHO及293F細胞株(資料未展示)。使用此等經轉染之細胞株作為後續組織染色實驗中之陽性對照物。

【0329】

正常人類PBMC

如圖13A中所示，mAb 18Y12及4A19不結合於PBMC。然而，16B13展示與非CCR8型目標之強效結合。儘管16B13展示有吸引力的特性，例如，以高親和力結合於經活化之Treg (實例11)、有效抑制CCR8表現細胞之鈣通量(實例15)及呈現高ADCC潛力或活性(實例17及19)，但在此mAb下觀測到的與PBMC之非特異性結合指示其在療法中之使用將存在除腫瘤浸潤性Treg以外的不表現CCR8之細胞之脫靶消耗之問題。

【0330】

不同人類組織類型

針對18種正常人類組織類型之集合(包括大腦、小腦、心臟、肝臟、肺、腎臟、扁桃體、脾、胸腺、結腸、胃、胰臟、腎上腺、垂體、皮膚、周邊神經、睪丸、子宮及PBMC塗片)測試mAb 18Y12及4A19 (對於每種測試物，n=1-2)，且使用表現hCCR8之CHO及293F細胞作為陽性對照

物。

【0331】 在主要位於胸腺之髓質(圖13B；18Y12-左側小圖及4A19-右側小圖)及皮膚之真皮(資料未展示)中的稀少及分散的免疫細胞中觀測到陽性染色，而未在所檢驗之其他組織(資料未展示)中觀測到陽性染色。在小鼠腫瘤模型中觀測到類似表現概況(資料未展示)。

【0332】 針對21種正常人類組織類型之集合(包括大腦、小腦、心臟、肝臟、肺、腎臟、扁桃體、脾、胸腺、結腸、胃、胰臟、腎上腺、甲狀腺、垂體、皮膚、周邊神經、前列腺、睪丸、子宮及PBMC塗片)測試mAb 16B13 (對於每種測試物，n=1-2)，且使用經hCCR8轉染之CHO細胞作為陽性對照物。

【0333】 在主要位於淋巴器官(胸腺[圖13B；中間小圖]、扁桃體、脾)及富含淋巴之組織(結腸及小腸；資料未展示)中的免疫細胞中觀測到最明顯的染色。染色為強烈的且在絕大部分免疫細胞中，特定言之，富含淋巴細胞之區域中擴散(例如，與脾中之紅髓相比，白髓中之染色明顯更強烈)，其中主要為細胞質及/或核周模式。在許多其中存在免疫細胞(包括肝臟中之庫氏細胞(Kuepfer cell)、肺中之肺泡巨噬細胞及腎臟之腎小球中之腎小球膜樣細胞)之組織中觀測到此染色。

【0334】 在PBMC塗片中，在未經固定(但經風乾)之塗片中未觀測到或觀測到最小染色，而在丙酮固定(亦即，透性化)之載玻片中發現核周細胞質染色，其進一步支持陽性標記係在細胞內發生之觀測結果。

【0335】 亦在內臟(小腸、結腸、胃)中之肌層中之平滑肌細胞、皮膚中之立毛肌及前列腺之基質以及大部分組織中之血管結構中觀測到強烈及彌漫性染色(主要在較高的3 μg/ml濃度下)。染色呈現細胞質模式。

【0336】 在大腦及小腦中之神經元及膠細胞以及神經垂體中之細胞之子集及周邊神經中之紡錘體間質性細胞中顯示強烈及彌漫性核周及/或細胞質染色。

【0337】 亦在上皮細胞之子集(包括心臟中之間皮、腎臟中之遠端或集合小管上皮之子集、垂體中之內分泌細胞、肺中之呼吸道上皮細胞、胰臟中之導管上皮、睪丸中之輸精管上皮之基底層及子宮之子宮內膜中之腺體上皮)中觀測到強烈及彌漫性細胞質染色。在大多數情況下，染色傾向於在高濃度(3 μg/ml)下更加明顯。

【0338】

實例15

抗hCCR8 MAb阻斷hCCL1與hCCR8表現細胞之結合

藉由對表現hCCR8之CHO細胞(hCCR8-CHO)進行鈣(CA)通量分析法來測試抗hCCR8 mAb阻斷hCCL1與hCCR8之結合，因為CHO細胞上之CCR8之CCL1接合誘導鈣通量。將hCCR8-CHO接種且在存在FLIPR Calcium 6染料(Molecular Devices)及丙磺舒(probenecid)(Thermo Fisher Scientific)之情況下，在37℃下培育2小時。在培育之後，向細胞中添加不同的抗CCR8 mAb且在室溫下靜置15分鐘，接著添加10 nM重組人類CCL1 (R&D Systems, Minneapolis, MN)。使用FLIPR Tetra系統(Molecular Devices)藉由最大-最小準則(Max-Min)來量測Ca通量螢光信號。使用GraphPad Prism計算半最大抑制濃度(IC_{50})。

【0339】 表6. 由抗CCR8 mAb進行的CCR8表現細胞上之鈣通量之阻斷

抗CCR8 MAb	IC_{50} (nM)
4A19	0.4645
16B13	0.2600
18Y12	0.2314
14S15	1.331
KLH-g1fnf	N/A
利妥昔單抗(抗CD20)	N/A

【0340】 阻斷CCL1與CCR8之結合之能力可對Treg具有抗抑制作用，且使用此功能作為選擇抗CCR8治療性Ab候選物之選擇準則。約52%的(96種中之50種)所測試之抗hCCR8 mAb阻斷hCCR8-CHO細胞上之CCL1結合(圖14A)。所選擇的此等Ab之子集阻斷CCR8-CHO細胞之CCL1誘導之Ca通量達51%-94% (圖14B)。在圖14C中展示4種所選擇的抗CCR8 mAb進行之hCCR8-CHO上的Ca通量之阻斷之IC_{50}曲線(IC_{50}範圍為0.23 nM至1.331 nM)，且此等mAb之IC_{50}值展示於表6中。

【0341】

實例16

抗mCCR8 MAb阻斷mCCL1與mCCR8表現細胞之結合

除了使用表現mCCR8之CHO細胞(mCCR8-CHO)代替hCCR8-CHO以外，藉由如實例15中所描述對mCCR8-CHO進行Ca通量分析法來測試由抗CCR8-mIgG2a進行之mCCL1與mCCR8之結合之阻斷。使用GraphPad Prism計算，測定IC_{50}為19.34 nM。

【0342】 為了使抗CCR8-mIgG2a充當適當的小鼠替代性Ab以用於測試經設計以用於人類使用之抗CCR8 Ab之治療功效，重要的是，此小鼠Ab呈現與其hCCR8 Ab對應物類似的功能特性。與抑制hCCL1誘導之Ca通量之抗hCCR8 mAb類似(圖14，表6)，發現抗CCR8-mIgG2a抑制mCCR8-CHO細胞中之mCCL1誘導之約通量，但有效性較低，其中IC_{50}值為19.34 nM，相比之下，在實例15中測試之抗hCCR8 Ab之所觀測之IC_{50}值為約

0.2 nM至1.3 nM。

【0343】

實例17

藉由進行CD16交聯之能力量測之抗hCCR8 MAb之ADCC潛力

藉由抗hCCR8 mAb介導CD16表現報導細胞之交聯之能力來量測此等Ab之ADCC潛力。經活化之人類Treg或表現hCCR8之Raji細胞與表現CD16之Jurkat NFAT螢光素酶報導細胞以1:5比率在存在抗CCR8 Ab或對照性Ab之情況下，在37℃下共同培養4小時。向細胞中添加BIO-GLO™ (Promega, Madison, WI)且在室溫下培育5分鐘，且接著讀取發光以用於量測螢光素酶活性。使用GraphPad Prism計算半最大有效濃度(EC_{50})。

【0344】 NK細胞經由Fc-γ受體3A (CD16)之接合或交聯來介導ADCC。如上文所描述，藉由表現CD16之細胞株來量測抗hCCR8 mAb介導目標細胞(表現hCCR8之Raji細胞或經活化之人類Treg)之ADCC之能力。在以表現CCR8之Raji細胞作為目標之情況下，百分之十六的所測試之具有人類IgG1 (hIgG1)主鏈之抗hCCR8 mAb呈現80-100%之最大CD16接合(圖15A)。將所選擇的mAb修飾成nf hIgG1格式(hIgG1-nf)且以相同方式篩選。

【0345】 表7. 由抗CCR8 mAb進行之CD16表現報導細胞之交聯

抗CCR8 MAb	EC_{50} (pM)
8D55	6.58
10R3	3.02
14S15	8.02
16B13	0.67
4A19	0.69
18Y12	0.698

【0346】 大多數此等抗CCR8 hIgG1-nf mAb實現80-100% CD16交聯(圖15A)。在經活化之人類Treg作為目標細胞之情況下，百分之二十七

的所測試之抗CCR8 hIgG1-nf mAb實現最大CD16接合(圖15A)。所測試之所選擇的抗hCCR8 hIgG1-nf mAb之集合的CD16交聯能力之EC_{50}值展示於圖15B及表7中。

【0347】

實例18

藉由進行小鼠FcgIV4$^+$報導細胞之交聯之能力量測的抗mCCR8 mAb之ADCC潛力

藉由量測抗CCR8-mIgG2a誘導小鼠FcgRIV$^+$報導細胞(Promega)之交聯之能力來間接評估其誘導ADCC介導之CCR8表現細胞之殺傷之能力。在此分析法中，將表現螢火蟲螢光素酶之FcgRIV$^+$效應細胞與來自小鼠脾細胞之原發性經活化之Treg或表現mCCR8之CHO細胞以1:5比率共同培養。細胞在存在抗CCR8-mIgG2a、具有惰性主鏈之抗CCR8-mIgG1-D265A或抗KLH-mIgG2a對照性Ab之滴定物之情況下，在37℃下共同培養4小時。以FcgRIV$^+$效應細胞之交聯及活化形式量測目標細胞殺傷活性，該交聯及活化展示在細胞與BIO-GLO™ (Promega)螢光素受質一起培育時產生之生物發光信號(RLU)之增加。

【0348】 在抗CCR8-mIgG2a之較高濃度下，觀測到效應細胞之特異性交聯(EC_{50}=6.34 nm)，由高螢光素酶信號證明。此表明Ab結合於目標細胞且與效應細胞中之FcgRIV接合。使用非目標特異性Ab (抗KLH-mIgG2a)及非FcγRIV接合性Ab (抗CCR8-mIgG1-D265A)(其皆不展示任何螢光素酶信號傳導)評估此相互作用之特異性。

【0349】

實例19

抗CCR8 MAb促進NK細胞介導之Treg之細胞毒性

測試呈現增強之效應功能的未經岩藻醣基化之抗hCCR8 mAb促進NK細胞介導之經活化之Treg細胞(如實例2中所描述製備)之細胞凋亡之能力。使用PBMC之Ficoll梯度分離自全血分離用作效應子之同種NK細胞，接著進行磁珠陰性選擇(Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA)以移除非NK細胞。自新鮮的健康供體PBMC (人類NK細胞分離套組，Miltenyi Biotec)分離NK細胞且在具有1 pM氫化可的松(hydrocortisone)(StemCell Technologies)及500 U/ml之重組人類IL-2 (PeproTech, Cranbury, NJ)之Myelocult H5100培養基(StemCell Technologies)中培養24小時以增加NK細胞活化。

【0350】 將NK細胞用CellTrace Violet (Thermo Fisher Scientific)進行螢光標記且在具有10%超低IgG FBS及1 mM丙酮酸鈉之RPMI培養基中與Treg細胞以5:1之比率組合。添加抗hCCR8 Ab及同型對照性Ab之滴定物且與細胞一起在37℃下培育3小時。在含有Ca^{2+}之緩衝液中用磷脂結合蛋白-V FITC結合之Ab及7-AAD將細胞染色且使用BD Fortessa X-20細胞計數器(BD Biosciences, San Jose, CA)藉由流式細胞測量術來量測細胞螢光。經由標準流式細胞測量術分析來測定全部Treg中之細胞凋亡Treg (磷脂結合蛋白-V陽性，CellTrace Violet陰性)之百分比。

【0351】 使用在存在抗hCCR8-hIgG1-nf mAb之情況下，由同種異體NK細胞引起之經活化之人類Treg之ADCC以評估抗CCR8 Ab介導腫瘤浸潤性Treg之消耗之能力。在經由CCR8結合(實例9)、CCL1阻斷(實例15)及CD16交聯分析法(實例17)篩選更大的抗hCCR8 Ab集合之後，評估Ab之子集經由NK細胞介導經活化之Treg之ADCC之能力。經歷由所選擇

的抗hCCR8-hIgG1-nf Ab誘導之細胞凋亡之細胞之中值百分比描繪於圖16中，表明此等在約34%至99%範圍內。由不同的抗CCR8 Ab介導之由同種異體NK細胞引起的經活化之Treg之殺傷之EC_{50}值展示於表8中，其中值在約13 pM至304 nM範圍內。

【0352】 表8. 由抗CCR8 mAb介導之經活化之Treg之ADCC殺傷

抗CCR8 MAb	中值EC_{50} (pM)
8D55	38.6
10R3	56.6
14S15	39.7
16B13	13.4
4A19	13.1
18Y12	18.6
12F27	3.04×10^5

【0353】

實例20

抗CCR8 MAb促進患者腫瘤中之Treg之消耗

測試未經岩藻醣基化之抗hCCR8 mAb促進NK細胞介導之來自人類患者之腫瘤Treg的細胞凋亡之能力。簡言之，自Discovery Life Sciences購得經解離之患者子宮內膜腫瘤。分離來自健康供體之NK細胞且如實例19中所描述進行預致敏隔夜以用於ADCC且進行螢光標記(CellTrace Violet, ThermoFisher)。接著，將此等NK細胞(1.875×10^5個細胞/孔)與子宮內膜腫瘤細胞(2.5×10^5個細胞/孔)以及抗hCCR8 (14S15)及對照性Ab(抗CCR4 mAb、莫格利珠單抗及抗KLH-nf同型)之滴定物一起在具有10%超低IgG FBS及1 mM丙酮酸鈉之RPMI培養基中，在37℃下培育24小時。針對Treg及其他淋巴細胞群體將所得細胞染色且經由流式細胞儀進行處理。使用Flowjo軟體分析Treg及習知T細胞出現率。

【0354】 為了測定抗hCCR8 Ab是否可特異性介導患者腫瘤浸潤性Treg之ADCC，將同種異體NK細胞與經消化之含有腫瘤浸潤性Treg之子

宮內膜腫瘤細胞共同培養。先前已證實莫格利珠單抗、抗CCR4-hIgG1nf Ab可介導癌症患者中之Treg殺傷。如圖17中所示，莫格利珠單抗及抗CCR8 mAb ，即14S15，皆誘導腫瘤Treg殺傷，其中14S15更有效(圖17A)。mAb 14S15特異性消耗子宮內膜腫瘤Treg (圖17A)，但不消耗習知$CD4^+FOXP3^-$ T細胞(圖17B)。相比之下，莫格利珠單抗亦消耗習知$CD4^+FOXP3^-$ T細胞。14S15不消耗任何其他淋巴細胞子集(資料未展示)。

【0355】 在另一實驗中，產生若干種具有以下人類重鏈變異體之針對hCCR8之Ab:1) hIgG1；2) nf IgG1 (IgG1-nf)，其與IgG1相比呈現明顯更高的FcγR結合親和力且可勝過內源性IgG以結合於CD16，從而引起ADCC/ADCP (Iida, 2006)；及3) IgG1-L234A-L235E-G237A (hIgG1-惰性)，其最低程度地接合FcγR (Hezareh et al., 2001)。作為IgG1-nf Ab之抗人類CCR8純系16B13及14S15活體外結合於經活化之人類$FOXP3^+$ Treg，阻斷CCL1結合且在結合於經活化之Treg上之CCR8時與CD16交聯(實例11、15及17；Campbell等人, 2021，其中將16B13稱為CCR8.1且將14S15稱為CCR8.2)。純系16B13-IgG1亦能夠與CD16交聯，但效能低於其IgG1-nf對應物(Campbell等人, 2021)，而16B13-IgG1-惰性完全不能介導CD16交聯(Campbell等人, 2021)。

【0356】 接著測定抗hCCR8-IgG1-nf Ab消耗來自周邊血液及原發性人類腫瘤樣本之$FOXP3^+$ Treg之能力。藉由在U形底96孔盤(Corning)中，在培養基及100 U/ml之IL-2 (Peprotech)中，將2.0×10^5個PBMC在37℃下培育48小時來進行PBMC消耗分析法。在兩天之後，添加相關Ab且再培育細胞96小時，接著進行流式細胞分析。

【0357】儘管14S15-IgG1-nf消耗周邊血液Treg之子集(小於50%)(圖18A)，但nf抗人類CCR4 Ab (抗hCCR4-IgG1-nf，莫格利珠單抗生物類似物)移除超過90%的此等細胞(圖18A)以及約一半的周邊$CD4^+$ Tconv (圖18B)。兩種Ab皆不影響$CD8^+$ T細胞群體(圖18C)。因此，用抗hCCR8-IgG1-nf Ab處理經活化之PBMC可消耗周邊血液Treg之子集，但重要的是，不消耗Teff細胞。在乳癌患者中，TCR定序揭示周邊血液$CCR8^+$ Treg與腫瘤Treg之間的顯著純系重疊(Wang等人, 2019)，表明：(1)來自周邊之Treg純系移轉至腫瘤中且擴增且引起Treg抑制，或(2)來自腫瘤微環境之經活化之Treg擴增至周邊中。兩種情形可同時發生且引起循環性$CCR8^+$ Treg浸潤至腫瘤轉移性位點中以介導免疫抑制。與機制無關，此等結果表明$CCR8^+$ Treg之成批消耗可充當全身性移除周邊或腫瘤中之腫瘤特異性Treg之方法。

【0358】為了測試離體腫瘤樣品中之抗CCR8介導之消耗，將NSCLC手術切除物之細胞懸浮液與來自健康供體血液之經活化之同種異體NK細胞一起培養。添加14S15-IgG1-nf可引起$FOXP3^+$ Treg之出現率降低(圖18D)，而對整體$CD4^+$ Tconv (圖18E)或$CD8^+$ T細胞出現率(圖18F)無任何影響。相比之下，除消耗Treg (圖18D)以外，抗hCCR4-IgG1-nf亦消耗約30%的$CD4^+$ Tconv (圖18E)。在用16B13-IgG1-惰性進行之治療之後未觀測到Treg消耗(圖18G)。

【0359】測試在不存在同種異體NK細胞之情況下，16B13-IgG1-nf及4A19消耗離體患者腫瘤樣品中之Treg之能力。對於16B13研究，將新鮮的透明細胞腎細胞癌(RCC)及胃腫瘤組織包覆於瓊脂中且使用COMPRESSTOME®振動薄片切片機(Precisionary儀器；Greenville, NC)

製備連續的300 μM厚的薄片直至將所有腫瘤組織切片。在含有5 ml RPMI 1640細胞培養基(Corning)及補充有1 mM丙酮酸鈉及55 nM 2-巯基乙醇之10% FBS (Thermo Fisher Scientific)之6孔組織培養盤中，在兩片膠原蛋白止血劑(Becton Dickinson, Warwick, RI)之間培養組織切片。在80 rpm下旋轉之盤振盪器上，在37℃下培育切片培養物以促進培養基灌注。在24小時之後，用16B13-IgG1-nf或抗KLH-nf hIgG1同型對照物處理切片培養物孔。在與mAb一起培育3天之後，使用套組(Miltenyi Biotec)將腫瘤組織切片以酶促方式解離成單細胞懸浮液且染色以用於流式細胞測量術分析。測定$CD4^+$ T細胞中之$FOXP3^+$ Treg之百分比。

【0360】 如圖18H及18I中所示，在不添加同種異體NK細胞之離體患者腫瘤切片培養物系統中，用16B13-IgG1-nf處理腎細胞及胃腫瘤使Treg細胞之出現率降低約50%，證實內源性腫瘤駐留$Fc\gamma R^+$細胞足以現場介導針對$CCR8^+$目標細胞之ADCC/ADCP。

【0361】 對於4A19研究，將經切除之黑素瘤腫瘤切片且與10 μg/ml之4A19、莫格利珠單抗生物類似物或抗KLH-nf hIgG1同型對照物一起培養3天。在3天之後，將經處理之腫瘤切片解離成單個細胞懸浮液以用於流式細胞測量術分析。總體而言，當與用莫格利珠單抗生物類似物及同型處理之切片相比時，用4A19處理之腫瘤切片展示降低之$FOXP3^+$ CD4 Treg之百分比。

【0362】

實例21

抗CCR8 MAb不誘導CCR8之細胞內化

為了測定抗CCR8 Ab在結合於細胞表面上之CCR8時是否誘導CCR8

受體之內化，如實例2中所描述將Treg活化。向4×10^4個經活化之Treg中各自以10 μg/ml之濃度添加抗CCR8 mAb (4A19)、陽性對照性Ab (抗ICOS Ab)及同型對照物且在37℃下培育5個時段：0、30、60、90及120分鐘。此外，以5 μg/ml向樣品之子集中添加山羊抗人類Fc-γ Ab以使原發性Ab交聯。在各時段之後，向Treg中添加疊氮化鈉溶液且將混合物置放於冰上以防止進一步受體內化。最終，所有樣品用0.05%疊氮化鈉溶液洗滌兩次，接著用適當的藻紅素(PE)結合之二級Ab染色。用2%多聚甲醛(PFA)將細胞固定，接著用細胞計數器進行分析。藉由如使用Flowjo軟體測定之中值螢光強度來量測細胞表面上之CCR8表現量。

【0363】 如圖19中所示，抗ICOS mAb在不存在交聯Ab之情況下在120分鐘時段內引起最小的ICOS內化，但在存在交聯Ab之情況下引起顯著的ICOS內化。相比之下，抗CCR8 mAb，即4A19，在存在或不存在交聯Ab之情況下皆不引起CCR8之內化。在存在或不存在交聯二級Ab之情況下用同型Ab處理經活化之Treg皆不引起CCR8之內化。

【0364】

實例22

活體外人類腫瘤Treg之消耗

分離供體自然殺手(NK)細胞且使用Myelocult H5100 (StemCell)、1 pM氫化可的松及500 U/ml之IL-2 (PeproTech)活化24小時。將冷凍的經解離之人類肺腺癌組織(Discovery Life Sciences)解凍且在存在抗hCCR8 (mAb 4A19)、抗hCCR4 hIgG1-nf (莫格利珠單抗生物類似物)或對照性nf匙孔螺血氰蛋白(KLH-nf)mAb之情況下，以1:1比率與2.5×10^5個同種異體NK細胞共同離體培養24小時。將細胞染色且使用Flowjo軟體藉由流式細

胞測量術來量測Treg消耗以計算細胞群體。

【0365】 如圖20中所示，mAb 4A19誘導可量測之腫瘤Treg之消耗而不影響Teff之出現率或數目。此在用經消化之患者腫瘤及患者腫瘤切片外植體系統進行之同種異體NK殺傷分析法中得到證實。與抗CCR4-nf Ab相比，mAb 4A19更有效地實現活體外Treg消耗(圖20A)。此外，與抗CCR4-nf Ab相比，mAb 4A19不誘導$CD4^+$效應T細胞之消耗(圖20B)。抗CCR8或抗CCR4皆不消耗$CD8^+$效應T細胞(圖20C)。

【0366】 具有無關靶向臂(抗KLH-nf)或惰性主鏈(抗CCR8-惰性)之Ab不消耗Treg，表明Treg消耗需要目標介導之經由nf主鏈進行之FcγR接合(圖20D)。

【0367】

實例23

抗CCR8 MAb降低CT26小鼠腫瘤模型中之腫瘤生長

使用多種小鼠腫瘤模型(亦即，同基因型CT26、MC38及SA1N模型，以及對抗PD-1治療具有抗性之腫瘤模型MB49及4T1)測試抗CCR8 mAb之作用。以200微克/小鼠進行所有Ab處理且在所有研究中每週兩次量測腫瘤。

【0368】 在CT26小鼠結腸腺癌模型中評估抗mCCR8 mAb (抗CCR8-mIgG2a)之抗腫瘤活性。將十五週齡雌性BALB/cAnNHsd小鼠各自皮下植入(SC)10^6個CT26腫瘤細胞。在腫瘤植入後第7天，當腫瘤達到約100 mm^3之中值尺寸時，以10隻小鼠/組將小鼠隨機分配至處理組中。在植入後第7、10及14天，經由IP注射以200 μl之體積，以200 μg/小鼠投與在PBS中調配之Ab (抗CCR8-mIgG2a或對照性mIgG2a同型Ab)。記錄腫

瘤體積、體重及臨床觀測結果以確定測試藥劑之功效及耐受性。使用以下等式將腫瘤測徑器量測結果轉換為腫瘤體積：體積=½(長度×寬度×高度)。每週記錄腫瘤量測結果兩次直至植入後第35天。在研究時，小鼠隨意取食無菌嚙齒動物食物及水且在12小時照明/黑暗循環下圈養於具有頂部無菌過濾器之籠子中。根據國際實驗動物護理評估及認可委員會(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International)之指南進行所有小鼠實驗。

【0369】 資料表明抗CCR8-mIgG2a有效降低腫瘤生長之速率，其中10隻小鼠中之8隻在植入後第28天不具有腫瘤，而用對照性mIgG2a Ab進行之處理不抑制腫瘤生長(圖21A)。對於在小鼠腫瘤模型中進行之實驗，在Ab之最後一次投藥之後針對腫瘤復發來監測無腫瘤小鼠>25天。經對照物處理之小鼠之量測在腫瘤植入後約35天之後停止，隨後處死其餘小鼠。經處理之小鼠之平均腫瘤體積展示於圖21B中，其證實抗CCR8 mAb對腫瘤生長之強效抑制及用同型對照物處理之腫瘤之不受抑制之生長。此等資料表明抗CCR8 Ab在此CT26小鼠模型中極有效地抑制腫瘤生長且與腫瘤浸潤性Treg之消耗相關聯。

【0370】 對於腫瘤浸潤性淋巴細胞之分析，在植入後第16天收集小鼠腫瘤。用膠原蛋白酶消化腫瘤，使用OctoMacs解離器(Miltenyi Biotech)以機械方式解離且經由無菌100 μM濾器過濾。藉由與FcR阻斷劑(Miltenyi Biotech)一起培育來將樣品針對Fc受體進行阻斷，接著針對淋巴細胞群體進行表面染色，固定，透性化及針對Foxp3進行細胞內染色。接著，洗滌細胞且經由流式細胞儀處理。使用FlowJo軟體進行分析且使用GraphPad Prism繪圖。

【0371】 如圖21C中所示，與用同型對照物處理之小鼠相比，用抗CCR8-mIgG2a處理攜帶CT26腫瘤之小鼠可顯著降低$CD4^+$ T細胞群體中之$Foxp3^+$ Treg之百分比，而脾中之Treg群體不受用抗CCR8-mIgG2a進行之處理影響(圖21D)。此等資料表明CCR8在腫瘤相關Treg之表面上特異性表現，但不在周邊Treg上表現且此外，Ab與CCR8之結合可介導藉由ADCC進行之腫瘤相關Treg之消耗。

【0372】

實例24

抗mCCR8僅介導腫瘤Treg之消耗，避開正常組織中之$CCR8^+$ T細胞

在CT26小鼠結腸腺癌模型中評估鼠類組織淋巴細胞群體。向雌性BALB/C小鼠皮下注射10^6個CT26腫瘤細胞。在12天之後，當藉由測徑器量測之腫瘤體積達到約100-150 mm^3時，根據腫瘤尺寸將小鼠隨機分配至處理組中。在植入之後第12、14及19天，向小鼠3次投與200 μg均一劑量(對於平均體重為21.2 g之小鼠，約10 mg/kg)之抗CCR8-mIgG2a或mIgG2a同型對照性mAb。在第20天，在第三次Ab給藥之後24小時，將小鼠處死，收集血液樣品且切除腫瘤、皮膚、脾及胸腺組織。

【0373】 將組織處理成單細胞懸浮液以用於流式細胞測量術。將腫瘤切碎且以酶促方式消化，以機械方式解離脾及胸腺組織且如實例2中所描述來消耗經解離之脾及血液樣品中之RBC。藉由與FcR阻斷劑(Miltenyi Biotech)一起培育來將來自經處理之組織之細胞懸浮液針對Fc受體進行阻斷，接著針對淋巴細胞群體進行表面染色，固定，透性化及針對Foxp3進行細胞內染色。接著，洗滌細胞且經由流式細胞儀處理。使用FlowJo軟體進行分析且使用GraphPad Prism將結果繪圖。

【0374】 在浸潤小鼠CT26腫瘤之T細胞中，與FOXP3$^-$CD4$^+$效應子(CD4eff)或CD8$^+$ T (CD8T)細胞相比，CD4$^+$FOXP3$^+$ Treg (Treg)具有最多的CCR8表現(圖22A)。亦在皮膚駐留T細胞群體上觀測到CCR8表現，脾或血液中之T細胞上之表現極少(圖22A)。在胸腺中，CCR8表現於CD4$^+$CD8$^-$ (單陽性)胸腺細胞之子集上(圖22B)。在用抗CCR8-mIgG2a處理之後，消耗腫瘤浸潤性Treg，而不消耗脾、血液及皮膚中之Treg(圖22C)。亦不影響胸腺細胞(圖22D)以及皮膚中之CD4$^+$ (圖22E)及CD8$^+$ (圖22F)T細胞。因此，在小鼠CT26腫瘤模型中，用抗mCCR8消耗性Ab進行之處理選擇性地消耗腫瘤中之CCR8$^+$ Treg，但不消耗皮膚、胸腺、脾或血液中之相對較低數目之CCR8$^+$ T細胞。

【0375】

實例25

抗CCR8 MAb降低MC38小鼠腫瘤模型中之腫瘤生長

在MC38小鼠結腸腺癌模型中量測抗CCR8-mIgG2a之抗腫瘤活性。向十五週齡雌性FOXP3_IRES-EGFP (C57BL/6)小鼠(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)各自SC植入10^6個MC38腫瘤細胞且腫瘤植入後第7天以10隻小鼠/組隨機分配至處理組中。在植入後第7、10及14天，經由IP注射以200 μl之體積，以200微克/小鼠投與Ab (抗CCR8-mIgG2a或對照性mIgG2a Ab)。每週兩次記錄腫瘤量測結果直至植入後第51天，隨後處死小鼠。使用GraphPad Prism進行資料分析及繪圖。

【0376】 資料表明抗CCR8-mIgG2a有效降低腫瘤生長速率，其中10隻小鼠中之7隻在植入後第51天具有小於10 mm^3之腫瘤體積，相比之下，展示不受抑制之生長的腫瘤之平均體積超過1,100 mm^3，而用對照性

mIgG2a Ab進行之處理不抑制腫瘤生長(圖23A)。經處理之小鼠之平均腫瘤體積展示於圖23B中，其證實抗CCR8-mIgG2a對腫瘤生長之強效抑制及用同型對照物處理之腫瘤之不受抑制之生長。此等資料表明抗CCR8 Ab在此MC38小鼠模型中極有效地抑制腫瘤生長。

【0377】

實例26

MC38小鼠腫瘤模型中對抗CCR8 MAb處理之藥效學及藥物動力學反應

向C57BL/6小鼠SC注射1.0×10^6個MC38細胞。用測徑器以二維方式量測腫瘤且腫瘤體積計算為$L\times(W^2/2)$，其中L=長度(2個量測結果中之較長者)且W=寬度。當平均腫瘤體積達到約77 mm^3時，將小鼠隨機分為6個組，每組25隻小鼠(21隻小鼠用於同型對照)，且在植入後第10天，以表9中展示之劑量，藉由IP注射來投與在PBS中稀釋之抗CCR8-mIgG2a或mIgG2a同型對照物。針對體態、整毛及呼吸變化以及嗜睡每天檢查小鼠。每週至少兩次記錄腫瘤及組體重直至死亡、處死或研究時段結束。若腫瘤體積達到大於約2,000 mm^3或出現潰瘍，則將動物處死。

【0378】 為了研究抗mCCR8 mAb對腫瘤浸潤性淋巴細胞之作用，在處理後第3、5及10天收集腫瘤(n=7隻小鼠/處理組)。使用gentleMACS C試管獲得來自腫瘤之單細胞懸浮液。使細胞懸浮液通過70 μm濾波器，接著進行粒化。在再懸浮之後，使用Vi細胞計數器(Beckman Coulter, Miami, FL)對細胞進行計數。接著，以3.0×10^6個細胞/孔將細胞塗佈於96孔盤中且使用流式細胞測量術Ab針對免疫細胞子集及功能性標記物進行染色。用Fortessa X-20細胞計數器(BD Biosciences)藉由流式細胞測量術來偵測Ab螢光且使用FlowJo軟體分析結果。

【0379】 為了評估抗mCCR8 mAb之藥物動力學(PK)，在給藥後4、24、72、120、168及240小時藉由尾部血或末端血來獲得全血樣品(n=4隻小鼠/時間點)。使血液樣品凝固且在4℃下離心(1,500至2,000×g)以獲得血清。將血清樣品儲存於-80℃下直至分析。使用免疫捕獲LC-MS/MS分析小鼠血清樣品以用於偵測抗mCCR8 mAb。使用參考材料製備校準物及品質對照樣品。抗mCCR8 mAb校準曲線之範圍為於小鼠血清中之200至200,000 ng/ml。定量之上限及下限分別為200,000及200 ng/ml (亦即，ULOQ 200,000 ng/ml，LLOQ 200 ng/ml)。使用Phoenix WinNonlin軟體(Certara, Menlo Park, CA)，藉由血清濃度與時間資料之非分室分析來獲得PK參數。使用線性及對數梯形求和之組合來計算自時間零至最後一次採樣時間之曲線下面積[AUC (0-T)]及自時間零至無窮之曲線下面積[AUC (INF)]。在IP投藥之後估計CLT Vss及$T_{1/2}$。特定言之，CLT為藥物之總清除率且Vss為(藥物)之穩態分佈體積。使用最少3個端點時間點及可定量之濃度進行半衰期($T_{1/2}$)之估計。

【0380】 與實例25中之結果一致，用單次劑量之抗mCCR8 mAb進行之處理在MC38模型中引起降低之腫瘤生長。在處理後第10天，平均腫瘤體積係如圖24A及表9中所示。

【0381】 表9. 由抗CCR8 mAb介導之經活化之Treg之ADCC殺傷

組	Ab處理(劑量)	第10天時之腫瘤體積(mm^3)	Treg百分比	$CD8^+$ T細胞百分比
1	對照物(10 mg/kg)	629	59.5 ± 12.8	10.1 ± 2.0
2	CCR8 (0.03 mg/kg)	453	57.3 ± 13.8	17.8 ± 11.3
3	CCR8 (0.1 mg/kg)	438	51.4 ± 13.8	21.2 ± 8.4
4	CCR8 (0.3 mg/kg)	375	28.9 ± 5.2	29.0 ± 15.0
5	CCR8 (1 mg/kg)	161	38 ± 14.7	31.7 ± 15.5
6	CCR8 (3 mg/kg)	207	21.6 ± 6.5	32.0 ± 13.1

【0382】 MC38模型中之免疫表型分型研究進一步表明抗mCCR8以

劑量依賴性方式誘導Treg消耗。在處理後第5天，在0.03及0.1 mg/kg之較低劑量下用抗mCCR8處理之小鼠中的平均Treg百分比(±SD)(Foxp3+/$CD4^+$ T細胞百分比)保持與經同型對照物處理之組類似(參見圖24B；表9)。

【0383】 在處理後第5天，與經同型對照物處理之組相比，經抗mCCR8 mAb處理之組中之腫瘤浸潤性$CD8^+$ T細胞之出現率(%)增加，如圖24C；表9中所示。

【0384】 抗CCR8-mIgG2a之單一IP劑量在0.03至3 mg/kg之劑量範圍內顯示非線性PK，表明目標介導之藥物處置(TMDD)。與0.3 mg/kg劑量相比，$T_{1/2}$與1及3 mg/kg劑量之$T_{1/2}$相比增加約三倍(圖24D)。

【0385】

實例27

抗CCR8及抗PD-1 MAb在MB49小鼠膀胱癌腫瘤模型中協同降低腫瘤生長

在已知對抗mPD-1單藥療法之反應較低的MB49鼠類膀胱癌模型中以單一藥劑或與抗mPD-1 Ab (純系4H2)之組合形式量測抗CCR8-mIgG2a之抗腫瘤活性。亦用對照性mIgG2a Ab或單獨的4H2處理小鼠。抗mPD-1純系4H2為由大鼠IgG2a抗小鼠PD-1 Ab構築之嵌合大鼠-小鼠抗mPD-1 mAb，其中Fc部分由來自小鼠IgG1同型之Fc部分置換以產生具有降低之與小鼠FcR之結合之mAb (Li等人, 2009)。其阻斷mPD-L1及mPD-L2與mPD-1之結合，刺激T細胞反應且在小鼠中呈現抗腫瘤活性，且係如先前所描述來產生(Li等人, 2009)及在CHO細胞中表現。

【0386】 向十五週齡雄性C57BL/6 Foxp3-IRES-EGFP小鼠SC注射2×10^5個MB49腫瘤細胞且在腫瘤植入後第9天隨機分配至處理組中，每組

10隻小鼠。在植入後第10、13及18天經由IP注射以200微克/小鼠投與mAb。每週兩次記錄腫瘤量測結果直至第39天，隨後處死小鼠。

【0387】 對於腫瘤浸潤性淋巴細胞之分析，在植入後第17天收集小鼠腫瘤。用膠原蛋白酶消化腫瘤，使用OctoMacs解離器(Miltenyi Biotech)以機械方式解離且經由無菌100 μM濾器過濾。用FcR阻斷劑針對Fc受體來阻斷樣品，接著針對淋巴細胞群體進行表面染色。接著，洗滌細胞且經由流式細胞儀處理。使用FlowJo軟體進行分析且使用GraphPad Prism繪圖。

【0388】 如圖25A中所示，單藥劑抗CCR8及抗PD-1處理在小鼠MB49腫瘤模型中誘導部分抗腫瘤活性，其中抗CCR8 mAb之作用強於抗PD-1 mAb。然而，抗CCR8及抗PD-1 mAb之組合投藥具有協同作用，其幾乎完全抑制腫瘤生長，引起10隻小鼠中之8隻不具有腫瘤。此表明在低免疫原性腫瘤模型中，抗PD-1處理可以協同方式增強抗CCR8之抗腫瘤活性。若Ab之組合之抗腫瘤作用大於由各Ab個別地呈現之抑制水準之總和，則認為該組合具有協同性。

【0389】 圖25B展示在各種Ab處理之後，腫瘤相關$CD4^+$ T細胞(其為Treg)之百分比。儘管抗CCR8單一藥劑及抗CCR8/抗PD-1組合處理之腫瘤Treg之消耗量類似，但單藥劑抗CCR8治療組在抑制腫瘤生長方面不足。

【0390】 圖25C展示在各種Ab處理之後，腫瘤相關$CD45^+$ T細胞(其為$CD8^+$ T細胞)之百分比。發現單藥劑及組合組之$CD8^+$ T細胞擴增量類似。然而，可由組合處理來改良$CD8^+$ T細胞反應之品質。

【0391】

實例28

抗CCR8及抗PD-1 MAb在4T1鼠類乳癌模型中協同降低腫瘤生長

在4T1乳癌模型(另一種對抗mPD-1單藥療法具有抗性之小鼠腫瘤模型)中以單一藥劑或與抗PD-1 Ab(純系4H2)之組合形式量測抗CCR8-mIgG2a之抗腫瘤活性。亦用單獨的4H2及對照性mIgG2a與mIgG1-D265A Ab之組合處理小鼠。向十五週齡雌性Balb/C小鼠(Envigo, Indianapolis, IN)SC注射10^6個4T1腫瘤細胞且在腫瘤植入後第7天，當腫瘤之中值尺寸達到約100 mm^3時隨機分配至處理組中，每組10隻小鼠。在植入後第7、10及14天，經由IP注射以200微克/小鼠投與Ab。每週兩次記錄腫瘤量測結果直至第27天，隨後處死小鼠。使用GraphPad Prism進行資料分析及繪圖。

【0392】 如圖26中所示，單一藥劑抗CCR8處理在小鼠4T1腫瘤模型中誘導部分抗腫瘤活性，而單獨的抗PD-1處理在此模型中未呈現任何抗腫瘤功效。儘管抗PD-1未實現腫瘤生長抑制，但此Ab與抗CCR8 Ab之組合產生強協同相互作用，由在抗CCR8下觀測到的抗腫瘤活性之顯著增強證明，其中10隻小鼠中之7隻具有小於20 mm^3之腫瘤體積，相比之下，展示不受抑制之生長的腫瘤之平均體積為約1,500 mm^3。結合MB49資料(實例27)，此表明在抗PD-1抗性腫瘤模型中，抗CCR8處理在與抗PD-1處理組合時可誘導協同抗腫瘤作用。

【0393】

實例29

抗CCR8 MAb在SA1N纖維肉瘤小鼠模型中降低腫瘤生長

在SA1N纖維肉瘤小鼠模型中，量測抗CCR8-mIgG2a之抗腫瘤活性

且與CCR8-mIgG1-D265A (一種具有Fc-惰性mIgG1-D265A重鏈之變異體)進行比較。向雌性A/J各自SC注射10^6個SA1N腫瘤細胞且在腫瘤植入後第5天隨機分配至處理組中，每組9隻小鼠。在植入後第5、8及12天，經由IP注射以200 μl之體積，以200/小鼠投與Ab (抗CCR8-mIgG2a、抗CCR8-mIgG1-D265A或對照性mIgG2a Ab)。每週兩次記錄腫瘤量測結果直至植入後第57天，隨後處死小鼠。使用GraphPad Prism進行資料分析及繪圖。

【0394】 對於腫瘤浸潤性淋巴細胞之分析，在植入後第16天收集小鼠腫瘤。以機械方式解離腫瘤且經由無菌100 μM濾器過濾。用FcR阻斷劑針對Fc受體來阻斷樣品，接著針對淋巴細胞群體進行表面染色，固定，透性化且針對Foxp3進行細胞內染色。接著，洗滌細胞且經由流式細胞儀處理。使用FlowJo軟體進行分析且使用GraphPad Prism繪圖。

【0395】 資料表明抗CCR8-mIgG2a有效降低腫瘤生長速率，其中9隻小鼠中之9隻在植入後第25天不具有腫瘤，而用對照性mIgG2a mAb進行之處理未抑制腫瘤生長(圖27A)。經對照物處理之小鼠之量測在腫瘤植入後約57天之後停止，隨後處死其餘小鼠。此等資料表明抗CCR8 Ab在此SA1N小鼠模型中極有效地抑制腫瘤生長。有趣的是，用非消耗性抗CCR8 mAb (CCR8-mIgG1-D265A)處理小鼠引起腫瘤生長之部分抑制(圖27A)，表明至少在SA1N腫瘤模型中，由CCL1進行之CCR8接合可增強腫瘤環境中之Treg之免疫抑制。

【0396】 圖27B展示在各種Ab處理之後，腫瘤相關$CD4^+$ T細胞(其為Treg)之百分比。儘管在非消耗性抗CCR8-mIgG1-D265A處理下觀測到抗腫瘤活性，但僅消耗性抗CCR8-mIgG2a處理引起腫瘤Treg消耗。阻斷

CCL1介導之Treg抑制之增強可引起增加之促炎性及抗腫瘤反應。

【0397】

實例30

抗腫瘤功效需要抗CCR8之Fc接合型同型

為了進一步研究在抗腫瘤免疫中CCR8阻斷與Ab介導之Treg細胞消耗之相關貢獻，將抗mCCR8 Ab (來自BioLegend之純系SA214G2)工程改造成Fc接合型(抗CCR8-mIgG2a)及非Fc接合型或惰性(抗CCR8-mIgG1-D265A)同功異型物，且用抗CCR8-mIgG2a或抗CCR8-mIgG1-D265A處理攜帶MC38腫瘤之小鼠。mIgG2a同型強效接合Fc受體以促進ADCC及ADCP，而mIgG1-D265A版本並非如此(Baudino等人, 2008；Nimmerjahn等人, 2010)。用抗CCR8-mIgG2a進行之處理誘導明顯的腫瘤消退(圖28A及D)，而與用IgG2a同型對照物進行之處理(圖28A及B)相比，抗CCR8-mIgG1-D265A處理在此MC38模型中對腫瘤生長不具有可辨別的作用(圖28A及C)。重要的是，在用抗CCR8-mIgG2a處理後，腫瘤中之Treg之出現率降低75%，而抗CCR8-mIgG1-D265A處理未引起腫瘤Treg之出現率降低(圖28E)。此與活體外實驗之結果一致，該等實驗表明儘管mAb 4A19介導腫瘤Treg之消耗，但具有惰性主鏈之抗CCR8 Ab (抗CCR8-惰性)不消耗Treg，表明Treg消耗需要目標介導之經由nf主鏈進行之FcγR共同接合(實例22)。其亦與在SA1N腫瘤模型中觀測到的結果類似，在該腫瘤模型中，儘管用抗CCR8-mIgG1-D265A進行之處理引起腫瘤生長之部分抑制(實例29)，但未消耗免疫抑制性腫瘤Treg (圖27B)。

【0398】 實際上，儘管具有類似結合特徵，但抗CCR8-mIgG2a在存在表現CCR8之目標細胞之情況下有效交聯FcγRIV，而CCR8-mIgG1-

D265A同功異型物並非如此(資料未展示；參見Campbell等人, 2021)。亦證實抗CCR8-mIgG2a及抗CCR8-mIgG1-D265A Ab皆以類似程度阻斷CCL1結合(資料未展示；參見Campbell等人, 2021)。

【0399】 可得出以下結論：抗腫瘤活性通常不需要CCR8阻斷，但在某些免疫原性較高之腫瘤(諸如SA1N)中，歸因於促炎性細胞介素之增加，阻斷CCL1結合可引起腫瘤生長之部分抑制。由免疫抑制性腫瘤Treg之消耗(其需要Fc接合型抗CCR8 Ab)引起更大的腫瘤消退。

【0400】

腫瘤中之FOXP3$^+$ Treg遷移係與CCR8無關的

作為正交方法，用同源Ccr8$^{+/+}$及Ccr8$^{-/-}$供體骨髓產生混合骨髓嵌合體以測定CCR8是否促進Treg之趨化性遷移從而產生腫瘤。

【0401】

骨髓嵌合體

以3小時間隔向雌性受體小鼠(WT-CD45.2-Thy1.1；Jackson Laboratory)提供2個劑量之4.5 Gy，接著靜脈內遞送同源*CCR8*$^{+/+}$ (WT-CD45.1-Thy1.2；Jackson Laboratory)及*CCR8*$^{-/-}$ (CCR8KOIB6N-CD45.2；Jackson Laboratory)骨髓。向小鼠提供抗生素水，監測8週且在移植後第8週抽血以評估供體細胞重組。接著，SC植入10^6個MC38細胞。在12天後收集腫瘤、全血、淋巴結及脾細胞以進行免疫監測。

【0402】 在8週重組階段之後，在血液中觀測到等效供體免疫細胞重組(資料未展示)。接著，向受體小鼠皮下植入MC38腫瘤。CCR8缺失型FOXP3$^+$細胞與其野生型對應物類似地積聚於腫瘤中(圖28F)，證實腫瘤中之FOXP3$^+$ Treg遷移係與CCR8無關的。

【0403】

實例31

抗CCR8介導之Treg消耗增強腫瘤特異性$CD8^+$ T細胞之記憶潛力

量測Treg消耗對識別腫瘤抗原AH1之長壽記憶$CD8^+$ T細胞之產生之作用(Huang等人, 1996)。

【0404】 向BALB/c小鼠皮下注射10^6個CT26腫瘤細胞且在腫瘤體積達到100-120 mm^3時隨機分配。在分級之後第1、4及8天，用每劑量200 μg之抗CCR8-mIgG2a及抗mCTLA-4-IgG2a處理Ab或IgG2a同型對照物經後眼眶來處理小鼠。在第9天收集腫瘤且在第11天以手術方式切除。在3個月之後，對小鼠進行抽血以定量AH-1特異性$CD8^+$ T細胞。由10^7 CFU表現AH-1肽之重組單核球增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)(LM-AH1A5)靜脈內攻擊小鼠。李斯特菌在經改良之無菌腦心浸出液培養液(Teknova Inc., Hollister, CA)中培養隔夜以實現10^9 CFU/ml之固定相培養且接著用漢克氏平衡鹽溶液(Hank's Balanced Salt solution；HBSS)稀釋至10^8 CFU/ml以用於免疫接種。在攻擊後五天，收集脾及血液且經處理以用於流式細胞測量術。

【0405】 如所預期，與對照物(圖29C)相比，抗mCTLA4-IgG2a及抗CCR8-mIgG2a誘導強效抗腫瘤反應(圖29A及B)及Treg消耗(圖29D)。在最後一次處理之後一天，用抗mCTLA-4-IgG2a或抗CCR8-mIgG2a處理之小鼠中的來自經切除之腫瘤之AH-1四聚物$^+$細胞之出現率傾向於高於用對照物處理之小鼠(圖29E)，且在切除之後3個月，血液及脾中之AH-1四聚物$^+$細胞仍較高(圖29F)。在用表現AH-1之單核球增多性李斯特菌株攻擊以評估AH-1特異性記憶回憶反應，最初用抗mCTLA-4-IgG2a或抗

CCR8-mIgG2a處理之小鼠與對照小鼠相比具有更大的AH-1四聚物$^+$效應子記憶細胞之回憶擴增(圖29G)。

【0406】 在AH1A5肽刺激之後，經抗CCR8處理之小鼠在脾中亦具有明顯更大的IFNγ$^+$及多功能IFNγ$^+$TNFα$^+$ CD8$^+$ T細胞之量值(圖29H及29I)，表明用抗CCR8-mIgG2a處理攜帶腫瘤之小鼠引起具有加強之效應功能之腫瘤抗原特異性CD8$^+$ T細胞之出現率提高。

【0407】

實例32

腫瘤細胞上之CCR8之差異性表現

使用CCR8及CD8A之基因表現資料以區分將受益於用抗CCR8 Ab進行之治療的腫瘤類型之優先級。由在https://www.cancer.gov/tcga訪問之TCGA Research Network產生之資料分析來自以下之RNA-seq基因表現資料：膀胱尿道上皮癌(BLCA)、乳房侵襲性癌(BRCA)、子宮頸鱗狀細胞癌及子宮頸內腺癌(CESC)、結腸腺癌(COAD)、食道癌(ESCA)、多形性神經膠母細胞瘤(GBM)、頭頸部鱗狀細胞癌(HNSC)、腎難染細胞(KICH)、腎透明細胞癌(KIRC)、腎乳頭狀細胞癌(KIRP)、急性骨髓性白血病(LAML)、腦部較低級別神經膠質瘤(LGG)、肝細胞癌瘤(LIHC)、肺腺癌(LUAD)、肺鱗狀細胞癌(LUSC)、間皮瘤(MESO)、卵巢漿液性囊腺癌(OV)、胰臟腺癌(PAAD)、嗜鉻細胞瘤及副神經節瘤(PCPG)、前列腺腺癌(PRAD)、直腸腺癌(READ)、肉瘤(SARC)、皮膚黑色素瘤(SKCM)、胃腺癌(STAD)、THCA、UCEC及UVM。使用用於產生有效之治療學上適用的研究(TARGET，https://ocg.cancer.gov/programs/target)新方案來研究血液學腫瘤，該方案之資料可在https://portal.gdc.cancer.gov/projects

及M2GEN腫瘤學研究資訊交換網路(M2GEN Oncology Research Information Exchange Network；ORIEN)https://www.oriencancer.org/datasets獲得。

【0408】比較各腫瘤類型之來自*CCR8*及*CD8A*之TMM標準化之經log2轉換之CPM值以及*CCR8*/*CD8A*之比率。在所研究之腫瘤類型中，發現HNSC、LUAD、STAD、LUSC、PAAD、READ、ESCA、BRCA、COAD、CESC、濾泡性淋巴瘤急性淋巴細胞性白血病及淋巴瘤具有最高的相對*CCR8*表現。在各腫瘤類型中，KIRC、LUAD、LUSC、SKCM、STAD、CESC、MESO、HNSC、PAAD及BRCA表現最高的相對*CD8A*表現。使用CD8A/CCR8之比率來富集亦具有CCR8表現之CD8A陽性腫瘤。在所分析之腫瘤類型中，HNSC、STAD、LUAD BRCA、LUSC、PAAD、LAML、CESC、SKCM及MESO表現最高的相對CD8A/CCR8表現。

【0409】相對高CCR8及CD8A表現及其高CCR8/CD8A比率將HNSC、LUAD、STAD、LUSC、PAAD、READ、ESCA、BRCA、COAD、CESC、濾泡性淋巴瘤、急性淋巴細胞性白血病及淋巴瘤鑑別為預期尤其適於用抗CCR8 Ab治療之腫瘤類型。

【0410】

實例33

多種人類癌症中之CCR8表現

為了知曉多種癌症類型之CCR8表現概況以支持適應症選擇，在具有較高CCR8表現量之腫瘤類型最有可能對CCR8 mAb療法起反應之潛在假設下，在來自兩個樣品集合(TR-TP及MTB集合)之17種癌症類型或亞型中

進行免疫組織化學(IHC)。

【0411】 TR-TP樣品集合包含6種腫瘤類型/亞型之全尺寸福爾馬林固定、石蠟包埋(FFPE)載玻片，包括結腸直腸腺癌(CRC)、頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC)、非小細胞肺腺癌(NSCLC-AD)、非小細胞肺鱗狀細胞癌(NSCLC-SQC)、胰臟癌及小細胞肺癌瘤(SCLC)，其中每種腫瘤類型研究14-24個樣品。FFPE組織樣品係自各種市售組織供應商獲得。

【0412】 此外，研究含有16種腫瘤類型/亞型之多腫瘤塊體(MTB)，包括膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、CRC、子宮內膜癌、胃癌、GBM、HNSCC、黑素瘤、NHL、NSCLC-AD、NSCLC-SQC、卵巢癌、RCC、前列腺癌及胰臟癌，其中每種腫瘤類型具有20個病例。以每個FFPE塊體計，各MTB含有單一適應症之5個病例及作為陽性對照之1個增生性扁桃體。MTB係由Discovery Life Sciences定製。

【0413】 為了偵測CCR8組織結合，研發自動IHC分析法且用市售小鼠抗hCCR8 mAb，純系433H (BD Biosciences)及Leica Bond RX System (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL)驗證。將載玻片脫蠟且根據常規組織學程序復水。將濕潤的載玻片裝載至Leica Bond RX自動IHC染色機上以進行熱誘導之抗原決定基回收(Heat Induced Epitope Retrieval；HER)及染色。在100℃下用Leica Bond回收溶液ER2 (pH 9)進行HER歷時30分鐘，且用Bond聚合物優化偵測系統(Leica)進行CCR8 IHC染色。簡言之，進行過氧化酶阻斷(Leica)歷時10分鐘，接著使用補充有0.5%人類γ球蛋白(Sigma)之Dako無血清蛋白質阻斷劑(Agilent, Santa Clara, CA)進行非特異性結合阻斷歷時20分鐘。將433H原發性Ab以0.25 μg/ml培育60分鐘，接著將兔抗小鼠連接子且接著抗兔Poly-HRP-IgG (Leica)各自培育8分

鐘。最終，使載玻片與DAB受質-色素原溶液(Leica)反應10分鐘。接著，用蘇木精(Leica)將載玻片對比染色5分鐘且脫水，清洗且根據常規組織學程序蓋上蓋玻片。使用Leica AT Turbo掃描儀掃描經染色之載玻片且使用HALO®軟體(Indica Labs, Albuquerque, NM)進行完整載玻片影像分析。CCR8表現報導為腫瘤區域內的所有細胞中之陽性細胞之百分比。在樣品之小型子集中，當委員會認證之病理學家認為影像分析分數未產生準確結果時，由病理學家進行人工目視評分。

【0414】 強CCR8陽性染色主要分佈於展示膜性及細胞質模式之免疫細胞之子集中。亦在少數病例中觀測到腫瘤細胞中之弱至中等細胞質染色。TR-TP全尺寸組織切片中之$CCR8^+$細胞之完整載玻片影像分析展示於圖30A中，而MTB集合中之$CCR8^+$細胞之完整載玻片影像分析展示於圖30B中。TR-TP及MTB資料集合皆指示在所評估之17種腫瘤類型中，CCR8表現在HNSCC中最高且在GBM中最低。按照最高至最低CCR8表現之順序，腫瘤群組排序如下：HNSCC、子宮頸癌、CRC、NSCLC-SCC、NSCLC-ADC、胰臟癌、胃癌、膀胱癌、乳房癌瘤、卵巢癌及GBM。RCC、前列腺、黑素瘤、子宮內膜及NHL腫瘤群組展示類似的CCR8表現量且低於在乳癌腫瘤群組中觀測到的表現。

【0415】 基於具有高CCR8表現之腫瘤更可能對CCR8 mAb療法起反應之假設，此等腫瘤分析資料支持適應症選擇之以下優先排序：HNSCC、子宮頸癌、CRC、NSCLC-SCC、NSCLC-ADC、胰臟癌、胃癌、膀胱癌及乳癌。

【0416】

實例34

用抗CCR8治療癌症之1/2期臨床研究

在具有所選擇的晚期實體腫瘤(亦即，NSCLC、SCCHN、CRC、胃/胃食道(GE)接合區癌及子宮頸癌)之患者個體中進行以單藥療法及與抗PD-1 mAb (尼沃單抗)之組合形式投與之4A19抗CCR8 mAb之1/2期研究，以尤其評估以單一藥劑及與尼沃單抗之組合療法形式投與4A19之安全性、耐受性且初步評估功效。

【0417】

研究設計

此研究由4個部分構成：以劑量遞增(部分1A)及劑量擴增(部分2A)方式，以單藥療法形式投與之4A19，以及以劑量遞增(部分1B)及擴增(部分2B)方式，與尼沃單抗組合投與之4A19。

【0418】 在劑量遞增階段，為了鑑別抗CCR8之適合的劑量，除了由每劑量水準至少1名個體組成之4A19單藥療法之最低的2個劑量水準(以最小化接收潛在次有效劑量之4A19之參與者之數目)以外，針對各劑量向至少3名個體投與某一範圍內之劑量之4A19。在部分1A中，以0.3、1、3、10、30、100、300及800 mg，每2週一次(Q2W)之均一劑量向個體靜脈內(IV)投與4A19。使用由基於藥理學及毒理學之方法之混合方法產生的全部資料獲得4A19之首次用於人體(FIH)之起始均一劑量，即0.3 mg (4 μg/kg)，IV，Q2W，以確保足夠的安全性同時最小化參與者對潛在次有效劑量之暴露及細胞介素釋放之風險。

【0419】 在部分1B中，向個體靜脈內投與相同均一劑量之4A19且IV投與FDA認可之均一劑量(480 mg，每4週一次(Q4W))之尼沃單抗。

【0420】 對於劑量擴增，開放包括來自遞增階段之不同腫瘤類型及

劑量水準之單一組及隨機化組以向每個組至少20名個體投與單藥療法及組合療法。

[0421] 所有個體完成至多3個研究週期：

(a) 篩選(直至第28天)，在此期間，評估個體以證實其滿足合格性準則且提供新鮮腫瘤活檢；

(b) 治療(自第一治療開始的至多26個研究療法循環[104週]，不考慮治療延遲，每個循環28天)；及

(c) 隨訪，包括安全性及存活率隨訪(治療結束[EOT]後歷時至多2年)。研究參與之最大持續時間為約4年(歷時至多28天之篩選，歷時至多2年之治療及歷時至多2年之隨訪)。

[0422] 向個體投與Ab藥物直至出現進展、不可接受之毒性、撤回同意書、完成26個研究療法循環(104週)或研究結束(以首先發生的為準)。

[0423] 表10. SEQ ID NO.及胺基酸序列概述

SEQ ID NO.	序列說明	胺基酸序列
1	人類CCR8之胺基酸序列	MDYTLDLSVT TVTDYYYPDI FSSPCDAELI QTNGKQLLAV FYCLLFVFSL LGNSLVILVL VVCKKLRSVT DVYLLNLAIS DLLFVFSLPF QTYYLLDQWV FGTVMCKVVS GFYYIGFFSG MFFLTIMSVD RYLAVVHAVY ALKVRTIRMG TTLCLAVWLT AAMATLPLLV FYQVASEDGV LQCYSFYNQQ TLKWKLFTHF KNNLLGLLIP FTIFMPTYLK LLLQLKRCQN DNKTKAIKLV LLVVIASLLF WVPFNVVLFL TSLHSMHLLD GCSISQQLTY ATHVTEVLSF THCCVNPVIY AFVGEKFRKY LSELFQKHCS QLSTLSRQST DTSEKSSFHS SRTGSQMVSM
2	人類CCR8序列之胺基酸殘基15-21	YYYPDLF
3	mAb 16B13中之VH之胺基酸序列	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWLSY ISSGSTTIAD ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCVRRL KGSHDYWGQG TLVTVSS
4	mAb 14S15中之VH之胺基酸序列	EVQLVESGGG LVQPKGSLKL SCVVSGFRFN PYAMNWVRQA PGKGLEWLGR IRSKSNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSM VYLQMNNVKT EDTAMYYCVG YSDLYVLDYW GQGTSVTVSS

SEQ ID NO.	序列說明	胺基酸序列
5	mAb 18Y12中之VH之胺基酸序列	QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT DYEMHWVKQT PVHGLEWIGA IDPETGGTAY NQKFKGKATL TADKSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCTGLR RKVYWGQGTT VTVSA
6	mAb 4A19中之VH之胺基酸序列	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DSEMHWVRQA TGQGLEWMGA IQPETGGTAY NQKFKARVTM TRDTSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARRR RNFDYWGQGT LVTVSS
7	mAb 2M18中之VH之胺基酸序列	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCVVSGFTFS NYAMHWVRQV PGKGLEWLSD ISRGGTTTDD ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARRR LGVFDYWGQG TLVTVSS
8	mAb 15C17中之VH之胺基酸序列	QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYDMNWVRQA PGKGLEWLSY ISSSGNKKDI ADSVKGRFTI SRDNAQNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARRR QGVFDIWGQG TLVTVSS
9	mAb 13T20中之VH之胺基酸序列	QVQLVESGGG LVKPRGSLRL SCAASGFTFS VAWMHWVRQA PGKGLEWVGR IKSKTDGGTT DYAAPVKGRF TISRDDSKNT LYLQMDSLKT EDTAVYYCTV VTMVRGVLYD FWGQGTLVTV SS
10	mAb 10R3中之VH之胺基酸序列	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVGI ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYSCARVP NWRGAFDIWG QGTMVTVSS
11	mAb 8D55中之VH之胺基酸序列	QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYNMHWVRQT PGKGLEWLSY ISSSRSTISY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARRW KGVFDYWGQG TLVTVSS
12	mAb 1V11中之VH之胺基酸序列	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYAMHWVRQA PGKGLEWLAV ISYDGSNKYD SDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQLNSLRAED AAVYYCARRG DYGTGGFDYW GQGTLVTVSS
13	mAb 11K16中之VH之胺基酸序列	QVQLVESGGG LVLPGGSLRL SCAASGFTFS SNNMHWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTISY ADSVRGRFTI SRDNAKNSLF LQMNSLRDED TAVYYCARRW RGVFDYWGQG TLVTVSS
14	mAb 12F27中之VH之胺基酸序列	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFSFR SYGIHWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKRY ADSVKGRFTI SRDNSKSTLS LQMNSLRAED TAVYYCAKGR RPSGYGAFDI WGQGTMVTVS S
15	mAb 16B13中之VL之胺基酸序列	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYG ASRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPITFG QGTKVEIK
16	mAb 14S15中之VL之胺基酸序列	DIVMTQAAPS VPVTPGESVS ISCRSSKSLL DSNGNTYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQDLEYP FTFGSGTKLE IK
17	mAb 18Y12中之VL之胺基酸序列	DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSRQSLV DSSGYTYLDW YLQKPGQSPK LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCSQSTHVP PTFGSGTKLE IK

SEQ ID NO.	序列說明	胺基酸序列
18	mAb 4A19中之V_L之胺基酸序列	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSLV DSSGNTYLDW YLQKPGQPPQ LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQSTHVP FTFGQGTKLE IK
19	mAb 2M18中之V_L之胺基酸序列	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGQ GTKVEIK
20	mAb 15C17中之V_L之胺基酸序列	DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS RWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK
21	mAb 13T20中之V_L之胺基酸序列	DIVMTQSPST LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSRLTFG GGTKVEIK
22	mAb 10R3中之V_L之胺基酸序列	EIVLTQSPDF QSVTPKEKVT ITCRASQSIG SDLHWYQQKP DQSPKLLIKY ASQSFSGVPS RFSGSGSGTD FSFTINSLEA EDAATYYCHQ SYSLPFTFGG GTKVEIK
23	mAb 8D55中之V_L之胺基酸序列	DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGQ GTKVEIK
24	mAb 1V11中之V_L之胺基酸序列	DIVMTQTPLS SPVTLGQPAS ISCRSSRSLV HSDGNTYLNW LQQRPGQPPR LLIYKISNRF SGVPDRFSGS GAGTDFTLKI TRVEAEDVGV YYCMQATQFP FTFGPGTKVD IK
25	mAb 11K16中之V_L之胺基酸序列	DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGQ GTKVEIK
26	mAb 12F27中之V_L之胺基酸序列	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSFPPTFGQ GTKVEIK
27	mAb 16B13中之V_H CDR1之胺基酸序列	GFTFSSFNMN
28	mAb 16B13中之V_H CDR2之胺基酸序列	YISSGSTTIA DADSVKG
29	mAb 16B13中之V_H CDR3之胺基酸序列	RLRGSFDY
30	mAb 16B13中之V_L CDR1之胺基酸序列	RASQGISSWL A
31	mAb 16B13中之V_L CDR2之胺基酸序列	GASRLQS
32	mAb 16B13中之V_L CDR3之胺基酸序列	QQYNSYPFT
33	mAb 14S15中之V_H CDR1之胺基酸序列	GFRFNPYAMN
34	mAb 14S15中之V_H CDR2之胺基酸序列	RIRSKSNNYA TYYADSVKD

SEQ ID NO.	序列說明	胺基酸序列
35	mAb 14S15中之V_H CDR3之胺基酸序列	YSDLYYLDY
36	mAb 14S15中之V_L CDR1之胺基酸序列	RSSKSLLHSN GNTFLY
37	mAb 14S15中之V_L CDR2之胺基酸序列	RMSNLAS
38	mAb 14S15中之V_L CDR3之胺基酸序列	MQHLEYPFT
39	mAb 18Y12中之V_H CDR1之胺基酸序列	GYTFTDYEMH
40	mAb 18Y12中之V_H CDR2之胺基酸序列	AIDPKTGSTA YNQKFKG
41	mAb 18Y12中之V_H CDR3之胺基酸序列	LRRDFDY
42	mAb 18Y12中之V_L CDR1之胺基酸序列	RSSKSLLHSN GNTFLY
43	mAb 18Y12中之V_L CDR2之胺基酸序列	RVSNRFS
44	mAb 18Y12中之V_L CDR3之胺基酸序列	SQSTHVPFT
45	mAb 4A19中之V_H CDR1之胺基酸序列	GYTFTDSEMH
46	mAb 4A19中之V_H CDR2之胺基酸序列	AIQPKTGGTA YNQKFKA
47	mAb 4A19中之V_H CDR3之胺基酸序列	RRRNFDY
48	mAb 4A19中之V_L CDR1之胺基酸序列	RSSQSLLHSS GNTYLH
49	mAb 4A19中之V_L CDR2之胺基酸序列	KVSNRFS
50	mAb 4A19中之V_L CDR3之胺基酸序列	SQSTHVPFT
51	mAb 2M18中之V_H CDRl之胺基酸序列	GFTFSNFNMI
52	mAb 2M18中之V_H CDR2之胺基酸序列	DISRGGTFIN DADSVKG
53	mAb 2M18中之V_H CDR3之胺基酸序列	RLGVFDY
54	mAb 2M18中之V_L CDR1之胺基酸序列	RASQGISSWL A
55	mAb 2M18中之V_L CDR2之胺基酸序列	AASSLQS

SEQ ID NO.	序列說明	胺基酸序列
56	mAb 2M18中之V_L CDR3之胺基酸序列	QQYNSYPPT
57	mAb 15C17中之V_H CDR1之胺基酸序列	GFTFSSYDMN
58	mAb 15C17中之V_H CDR2之胺基酸序列	YISSSSNGNKD DADSVKG
59	mAb 15C17中之V_H CDR3之胺基酸序列	RQGVDFDI
60	mAb 15C17中之V_L CDR1之胺基酸序列	RASQGISRWL A
61	mAb 15C17中之V_L CDR2之胺基酸序列	AASSLQS
62	mAb 15C17中之V_L CDR3之胺基酸序列	QQYNSYPPT
63	mAb 13T20中之V_H CDR1之胺基酸序列	GFTFSVANMD
64	mAb 13T20中之V_H CDR2之胺基酸序列	RIKSKTDGGT TDYAAPVKG
65	mAb 13T20中之V_H CDR3之胺基酸序列	VTMVRGVLYD F
66	mAb 13T20中之V_L CDR1之胺基酸序列	RASQSVSSNY LA
67	mAb 13T20中之V_L CDR2之胺基酸序列	GASSRAT
68	mAb 13T20中之V_L CDR3之胺基酸序列	QQYGSSRT
69	mAb 10R3中之V_H CDR1之胺基酸序列	GFTFSSYAMS
70	mAb 10R3中之V_H CDR2之胺基酸序列	LISYDGSNKY YADSVKG
71	mAb 10R3中之V_H CDR3之胺基酸序列	VFNMRGADDI
72	mAb 10R3中之V_L CDR1之胺基酸序列	RASQSIGSDL D
73	mAb 10R3中之V_L CDR2之胺基酸序列	YASQSFS
74	mAb 10R3中之V_L CDR3之胺基酸序列	QQSYSLPFT
75	mAb 8D55中之V_H CDR1之胺基酸序列	GFTFSNYNMI
76	mAb 8D55中之V_H CDR2之胺基酸序列	YISSSSRSIIS YADSVKG
77	mAb 8D55中之V_H CDR3之胺基酸序列	RWKGVFDY

SEQ ID NO.	序列說明	胺基酸序列
78	mAb 8D55中之V_L CDR1之胺基酸序列	RASQGISSWL A
79	mAb 8D55中之V_L CDR2之胺基酸序列	AASSLQS
80	mAb 8D55中之V_L CDR3之胺基酸序列	QQYNSYPPT
81	mAb 1V11中之V_H CDR1之胺基酸序列	GFTFSNYAMS
82	mAb 1V11中之V_H CDR2之胺基酸序列	YISGSNKYYSD SVKG
83	mAb 1V11中之V_H CDR3之胺基酸序列	RGSGIGGGFD Y
84	mAb 1V11中之V_L CDR1之胺基酸序列	RSSRSLVHSD GNTYLN
85	mAb 1V11中之V_L CDR2之胺基酸序列	KLSNRFS
86	mAb 1V11中之V_L CDR3之胺基酸序列	MQATQFPFT
87	mAb 11K16中之V_H CDR1之胺基酸序列	GFTFSSNNMS
88	mAb 11K16中之V_H CDR2之胺基酸序列	YISSSSSYIS YADSVRG
89	mAb 11K16中之V_H CDR3之胺基酸序列	RWRGVFDY
90	mAb 11K16中之V_L CDR1之胺基酸序列	RASQGISSWL A
91	mAb 11K16中之V_L CDR2之胺基酸序列	AASSLQS
92	mAb 11K16中之V_L CDR3之胺基酸序列	QQYNSYPPT
93	mAb 12F27中之V_H CDR1之胺基酸序列	GFSFRSYGIS
94	mAb 12F27中之V_H CDR2之胺基酸序列	VISYDGSNKR YADSVKG
95	mAb 12F27中之V_H CDR3之胺基酸序列	GDRPSGSGAF DI
96	mAb 12F27中之V_L CDR1之胺基酸序列	RASQGISSWL A
97	mAb 12F27中之V_L CDR2之胺基酸序列	AASSLQS
98	mAb 12F27中之V_L CDR3之胺基酸序列	QQYNSYPPT

SEQ ID NO.	序列說明	胺基酸序列
99	16B13之重鏈mAb之胺基酸序列	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFAMNWVRQA PGKGLEWLSY ISSGSSTIYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRDEDT AVYYCVRDQ. KGSDYYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSK. TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
	14S15之重鏈mAb之胺基酸序列	EVQLVESGGG LVQPKGSLKL SCVVSGFRFN PYAMNWVRQA PGKGLEWLGR IRSKSNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSM VYLQMNNVKT EDTAMYYCVG YSDNYVLDYW GQGTSVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
100		
101	18Y12之重鏈mAb之胺基酸序列	QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT DYEMHWVKQT PVHGLEWIGA IDPETGGTAY NQKFKGKATL TADKSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCTGLR RFYYWGQGTT VTVSAASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KRVEPKSCDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

SEQ ID NO.	序列說明	胺基酸序列
102	4A19之重鏈mAb之胺基酸序列	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DSEMHWVRQA TGQGLEWMGA IQPGTGGTAY NQKFKARVTM TRDTSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARRR RNDDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPG
103	mAb 14S15h中之V_H CDR1之胺基酸序列	GFRFGPYAMN
104	mAb 14S15h中之V_H CDR2之胺基酸序列	RIRSKSNNYE TYYADSVKD
105	mAb 14S15h中之V_H CDR3之胺基酸序列	YSDLYYLDY
106	mAb 14S15h中之V_L CDR1之胺基酸序列	RSSKSLLHSQ GNTYLY
107	mAb 14S15h中之V_L CDR2之胺基酸序列	RMSNLAS
108	mAb 14S15h中之V_L CDR3之胺基酸序列	MQHLEYPFT
109	人類CCR8序列之胺基酸殘基12-22	VTDYYYPDIFS
110	mAb 12F27之重鏈之胺基酸序列	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFSFR SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKRY ADSVKGRFTI SRDNSKSTLS LQMNSLRAED TAVYYCAKGR RPSGIGAFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDRSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K
111	mAb 16B13之輕鏈之胺基酸序列	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYG ASRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPFTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

SEQ ID NO.	序列說明	胺基酸序列
112	mAb 14S15之輕鏈之胺基酸序列	DIVMTQAAPS VPVTPGESVS ISCRSSKSLL HSNGNTYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP FTFGSGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
113	mAb 18Y12之輕鏈之胺基酸序列	DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSSGVTYLHW YLQKPGQSPK LLIYRVSNLE SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCSQSTHVP FTFGSGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
114	mAb 4A19之輕鏈之胺基酸序列	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSSGNTYLHW YLQKPGQSPQ LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHVP FTFGQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
115	mAb 14S15h中之Vh之胺基酸序列	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFRFG PYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKSNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCVG YSDLYVDYWG QGTLVTVSS
116	mAb 14S15h中之Vk之胺基酸序列	DIVMTQTPPS LPVNPGEPAS ISCRSSKSLL DSQGNTFLYW YLQKPGQSPQ LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGSDFTLKI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP FTFGPGTKVD IK
117	mAb 14S15h之重鏈之胺基酸序列	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFRFG PYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKSNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCVG YSDLYVDYWG QGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
118	mAb 14S15h之輕鏈之胺基酸序列	DIVMTQPPLS LPVNPGEPAS ISCRSSKSLL HSQGNTFLYW YLQKPGQSPQ LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGSDFTLKI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP FTFGPGTKVD IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

SEQ ID NO.	序列說明	胺基酸序列
119	12F27之嵌合mAb之胺基酸序列	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSFPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
120	小鼠CCR8之胺基酸序列	MDYTMDPNVT MIDYYPDFFT APCDAEQLIR GSMIYLAFLY CVLFVLGLIG NSLVILVLVG CKRLRSITDI YLLNLAASDL IFVLSLPFQT HYLLDQWVFG TAMCKVVSGL YYIGFFSSMF ITIMSVDRYL AIVHAVYALR VRTIRMGVSL CLAVWLAAVT ATLPLMVFYQ VASEDGVLQ CFQFYEEQST RWKLFTSFEK NILGLLIPFA IILFCYVRIL QQLRQCRNHN RTRALKVIIT VVLVFLLFWV PFNVALFLTS LHDLQLNLFD HCERSKQLDL AIQVTEVIAF THCCVNPVIY AF IGEKFKKHLM QVFQKSCSHI RSWLGRQMPV ESEERSLSSV SSSSTFYSNG VN

|(0424)|

參考文獻

Abhinandan KR, Martin AC (2008) Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. *Mol Immunol* 45:3832-3839.

Akinleye A, Rasool Z (2019) Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J HematolOncol* 12(92).

Al-Lazikani, Lesk AM, Chothia C (1997) Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* 273(4):927-48.

Alvisi G, Brummelman J, Puccio S, Mazza EMC, Tomada EP, Losurdo A *et al.* (2020) IRF4 instructs effector Treg differentiation and immune suppression in human cancer. *J Clin Invest* 130(6):3137-50.

Arce Vargas F, Furness AJS, Solomon I, Joshi K, Mekkaoui L (2017) Fc-optimized anti-CD25 depletes tumor-infiltrating regulatory T cells and synergizes with PD-1 blockade to eradicate established tumors. Immunity

46(4):577-86.

Baitsch L, Legat A, Barba L, Fuertes Marraco SA, Rivals JP *et al.* (2012) Extended coexpression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. *PloS One* 7(2): e30852.

Barsheshet Y, Wildbaum G, Levy E, Vitenshtein A, Akinseye C *et al.* (2017) $CCR8^{+}FOXp3^{+}$ Treg cells as master drivers of immune regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 14(23):6086-91.

Baudino L, Shinohara Y, Nimmerjahn F, Furukawa J-I, Nakata M, Martmez-Soria E *et al.* (2008) Crucial role of aspartic acid at position 265 in the C_{H2} domain for murine IgG2a and IgG2b Fc-associated effector functions. *J Immunol* 181(9):6664-9.

Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J *et al.* (2010) Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28:3167-75.

Brahmer JR, Hammers H, Lipson EJ (2015) Nivolumab: targeting PD-1 to bolster antitumor immunity. *Future Oncol* 11(9):1307-26.

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL *et al.* (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366:2455-65.

Callahan M, Postow MA, Wolchok JD (2016) Targeting T cell co-receptors for cancer therapy. *Immunity* 44(5):1069-78.

Campbell JR, McDonald BR, Mesko PM, Siemers NO, Singh PB *et al.* (2021) Fc-optimized anti-CCR8 antibody depletes regulatory T cells in human tumor models. *Cancer Res* (in press).

Chakravarthi BVSK, Nepal S, Varambally S (2016) Genomic and epigenomic alterations in cancer. *Am J Pathol* 186(7): 1724-35.

Chothia C, Lesk AM (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196:901-17.

Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill JS *et al.* (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342:877-83.

Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G,Cartron G, Colombat P, *et al.* (2004) Rituximab- dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 64:4664-9.

Dépis F, Hu C, Weaver J, McGrath L, Klebanov B *et al.* (2020) Preclinical evaluation of JTX-1811, an anti-CCR8 antibody with enhanced ADCC activity, for preferential depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells [abstract]. In: Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2020; 2020 Apr 27-28 and Jun 22-24. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 80(16 Suppl): Abstract nr 4532.

De Simone M, Arrigoni A, Rossetti G *et al.* (2016) Transcriptional landscape of human tissue lymphocytes unveils uniqueness of tumor-infiltrating T regulatory cells. *Immunity* 5:1135-47.

Drugs.com - Opdivo Approval History: https://www.drugs.com/history/opdivo.html, last accessed March 23, 2020.

European Patent No. EP 1176195, granted May 22, 2013 to Kyowa Hakko Kirin Co.

Farkona *et al.* (2016) Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine* 14:73.

Fares CM, Van Allen EM, Drake CG, Allison JP, Hu-Lieskovan S (2019) Mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade: why does checkpoint inhibitor immunotherapy not work for all patients? *ASCO Education Book* 39:147-64.

Finotello F, Trajanoski Z (2017) New strategies for cancer immunotherapy: targeting regulatory T cells. *Genome Medicine* 9:10.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of $CD4^+$ $CD25^+$ regulatory T cells. *Nature Immunol* 4(4):330-6.

Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi M *et al.* (2004) Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* 10:5650-5.

Goldman M, Craft B, Hastie M, Repecka K, McDade F *et al.* (2019) The UCSC Xena platform for public and private cancer genomics data visualization and interpretation. bioRxiv 326470; doi:

https://doi.org/10.1101/326470.

Gorelik L, Avgerinos G, Kunes Y, Marasco WA (2017) Preclinical characterization of a novel fully human IgG1 anti-PD-L1 mAb CK-301. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting, Apr 1-5, 2017, *Cancer Res* 77(13 Suppl): Abstract No. 4606.

Guo L, Zhang H, Chen B (2017) Nivolumab as Programmed Death-1 (PD-1) inhibitor for targeted immunotherapy in tumor. *JCancer* 8(3):410-416.

Hagemann UB, Gunnarsson L, Geraudie S, Scheffler U, Griep RA *et al.* (2014) Fully human antagonistic antibodies against CCR4 potently inhibit cell signaling and chemotaxis. PLoS ONE 9(7): e103776.

Han S, Toker A, Liu ZQ, Ohashi PS (2019) Turning the tide against regulatory T cells. Front Oncol *9: 279.*

Harbour BioMed (2020) Harbour BioMed presented its newly discovered anti-human CCR8 novel monoclonal antibodies at the 16th PEGS Boston 2020. September 2, 2020 press release, available at https://www.harbourbiomed.com/news/126.html# (last accessed February 22, 2020).

Haslam A, Prasad V (2019) Estimation of the percentage of us patients with cancer who are eligible for and respond to checkpoint inhibitor immunotherapy drugs. *JAMA Netw Open* 2(5): e192535.

Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O *et al.* (2014)

Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515: 563-7.

Hezareh M, Hessell AJ, Jensen RC, van de Winkel JG, Parren PW (2001) Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1. J Virol 75(24):12161-8.

Hollinger and Hudson (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotech* 23(9):1126-36.

Huang AY, Gulden PH, Woods AS, Thomas MC, Tong CD *et al.* (1996) The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 3(18):9730-5.

Huttenhower C, Flamholz AI, Landis JN, Sahi S, Myers CL *et al.* (2007) Nearest neighbor networks: clustering expression data based on gene neighborhoods. *BMC Bioinformatics* 8:250.

Iida S (2006) Nonfucosylated therapeutic IgG1 antibody can evade the inhibitory effect of serum Immunoglobulin G on antibody-dependent cellular cytotoxicity through its high binding to Fc RIIIa. *Clin Cancer Res* 12(9):2879-87.

Ishida T, Joh T, Uike N, Yamamoto K, Utsunomiya A *et al.* (2012) Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter phase II study. *JClin Oncol* 30:837-42.

Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT (2018) Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer* 118(1):9-16.

Kabat EA, Wu TT, Bilofsky H, Reid-Miller M, Perry H (1983) Sequence of proteins of immunological interest. Bethesda: National Institute of Health; 1983. 323

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edn. National Institutes of Health, Bethesda, MD.

Kamada T, Togashi Y, Tay C *et al.* (2019) PD-1+ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 116:999910008.

Kamta J, Chaar M, Ande A, Altomare DA, Ait-Oudhia S (2017) Advancing cancer therapy with present and emerging immuno-oncology approaches. *Front Oncol* 18(7):64.

Kaufman RJ, Sharp PA (1982) Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene. *Mol Biol* 159:601-21.

Kavanagh B, O'Brien S, Lee D, Hou Y, Weinberg V, Rini B *et al.* (2008) CTLA4 blockade expands FoxP3$^+$ regulatory and activated effector CD4$^+$ T cells in a dose- dependent fashion. Blood 112(4):1175-83.

Khattri R, Cox T, Yasayko S-A, Ramsdell F (2003) An essential role for Scurfin in CD4$^+$ CD25$^+$ T regulatory cells. *Nature Immunol* 4(4):337-42.

Korman AJ, Engelhardt J, Loffredo J, Valle J, Akter R *et al.* (2017) Next-generation anti- CTLA-4 antibodies [abstract]. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017; Apr 1-5, 2017; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 77(13 Suppl): Abstract nr SY09-01.

Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, Deenick EK, Niemela JE, Avery DT *et al.* (2014) Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in *CTLA4*. *Science* 345(6204):1623-1627.

Kumar P, Bhattacharya P, Prabhakar BS (2018) A comprehensive review on the role of co-signaling receptors and Treg homeostasis in autoimmunity and tumor immunity. *J Autoimmun* 95:77-99.

Kurose K, Ohue Y, Wada H, Iida S, Ishida T, Kojima T *et al.* (2015) Phase Ia study of FoxP3$^+$ CD4 Treg depletion by infusion of a humanized anti-CCR4 antibody, KW- 0761, in cancer patients. *Clin Cancer Res* 21(19):4327-36.

Lefranc MP, Pommie C, Ruiz M, Giudicelli V, Foulquier E *et al.* (2003) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev Comp Immunol* 27:55-77.

Li B, VanRoey M, Wang C, Chen TT, Korman A, Jooss K (2009) Anti-Programmed Death-1 synergizes with granulocyte macrophage colony-stimulating factor- secreting tumor cell immunotherapy providing therapeutic benefit to mice with established tumors. *Clin Cancer Res*

15(5):1623-34.

Lipson EJ, Sharfman WH, Drake CG, Wollner I, Taube JM *et al.* (2013) Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin Cancer Res* 19:462-8.

Liu SY, Wu YL (2017) Ongoing clinical trials of PD-1 and PD-L1 inhibitors for lung cancer in China. *J Hematol Oncol* 10(1):136.

Louis E, El Ghoul Z, Vermeire S, Dall'Ozzo S, Rutgeerts P *et al.* (2004) Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 19: 511-9.

Ludeman JP, Stone MJ (2014) The structural role of receptor tyrosine sulfation in chemokine recognition. *Br J Pharmacol* 171:1167-79.

Luke JJ, Zha Y, Matijevich K, Gajewski TF (2016) Single dose denileukin diftitox does not enhance vaccine-induced T cell responses or effectively deplete Tregs in advanced melanoma: immune monitoring and clinical results of a randomized phase II trial. *JImmunother Cancer* 4:35.

Martin A, Cheetham JC, Rees AR (1989) Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(23):9268-72.

MacCallum RM., Martin ACR, Thornton JT (1996) Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol* 262:732-745.

Mahvi DA, Liu R, Grinstaff MW, Colson YL, Raut CP (2018) Local

cancer recurrence: the realities, challenges, and opportunities for new therapies. *CA Cancer J Clin* 68(6):488-505.

Mehta AY, Heimburg-Molinaro J, Cummings RD, Goth CK (2020) Emerging patterns of tyrosine sulfation and O-glycosylation cross-talk and co-localization. *Curr Opin Struct Biol* 62:102-11.

Mellman I, Coukos G, Dranoff (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480: 480-9.

Miescher S, Spycher MO, Amstutz H, De Haas M, Kleijer M *et al.* (2004) A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the FcγRIIA and FcγIIIA genes. *Blood* 103: 4028-35.

Moore KL. (2003) The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation. *J Biol Chem* 278(27):24243-6.

Mossner E, Brunker P, Moser S, Puntener U, Schmidt C *et al.* (2010) Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti- CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 115:4393-402.

Muroyama Y, Nirschl TR, Kochel CM et al. (2017) Stereotactic radiotherapy increases functionally suppressive regulatory T cells in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Res* 5:992-1004.

National Cancer Institute (2021). The Cancer Genome Atlas Program. https://www.cancer.gov/tcga. Last accessed March 13, 2021.

Natsume A, Niwa R, Satoh M *et al.* (2009) Improving effector

functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC. Drug Des Devel Ther 3:7-16.

Ni X, Tao J, Barbi J, Chen Q, Park BV *et al.* (2018) YAP is essential for Treg-mediated suppression of antitumor immunity. *Cancer Discov* 8(8): 1026-43.

Nimmerjahn F, Lux A, Albert H, Woigk M, Lehmann C, Dudziak D *et al.* (2010) FcγRIV deletion reveals its central role for IgG2a and IgG2b activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(45):19396-401.

Nimmerjahn F, Ravetch JV (2005) Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310:1510-2.

Olafsen and Wu (2010) Antibody vectors for imaging. *Semin Nucl Med* 40(3):167-81.

Pardoll DM (2012) The blockage of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12: 252-64.

PCT Publication No. WO 2007/044756, published April 19, 2007 by ICOS Corp.

PCT Publication No. WO 2008/156712, published December 24, 2008 by Organon NV.

PCT Publication No. WO 2012/145493, published October 26, 2012 by Amplimmune, Inc.

PCT Publication No. WO 2013/173223, published November 21, 2013 by Bristol-Myers Squibb Co.

PCT Publication No. WO 2014/179664, published November 6, 2014 by AnaptysBio, Inc.

PCT Publication No. WO 2014/194302, published December 4, 2014 by Sorrento Therapeutics, Inc.

PCT Publication No. WO 2014/206107, published December 31, 2014 by Shanghai Junshi Biosciences Inc.

PCT Publication No. WO 2015/035606, published March 19, 2015 by Beigene, Ltd.

PCT Publication No. WO 2015/085847, published June 18, 2015 by Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd.

PCT Publication No. WO 2015/112800, published July 30, 2015 by Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

PCT Publication No. WO 2015/112900, published July 30, 2015 by Dana-Farber Cancer Institute, Inc. and Novartis AG

PCT Publication No. WO 2016/106159, published June 30, 2016 by Enumeral Biomedical Holdings, Inc.

PCT Publication No. WO 2016/149201, published September 22, 2016 by Cytomx Therapeutics, Inc.

PCT Publication No. WO 2016/197367, published December 15, 2016 by Wuxi Biologics (Shanghai) Co. Ltd.

PCT Publication No. WO 2017/020291, published February 9, 2017 by Wuxi Biologics (Shanghai) Co. Ltd.

PCT Publication No. WO 2017/020858, published February 9, 2017

by Wuxi Biologics (Shanghai) Co. Ltd.

PCT Publication No. WO 2017/024465, published by February 16, 2017 Innovent Biologics (Suzhou) Co., Ltd.

PCT Publication No. WO 2017/024515, published February 16, 2017 by Wuxi Biologics (Cayman) Inc.

PCT Publication No. WO 2017/025016, published February 16, 2017 by Innovent Biologics (Suzhou) Co., Ltd.

PCT Publication No. WO 2017/025051, published February 16, 2017 by Wuxi Biologics (Cayman) Inc.

PCT Publication No. WO 2017/034916, published March 2, 2017 by Eli Lilly and Co.

PCT Publication No. WO 2017/040790, published March 9, 2017 by Agenus Inc.

PCT Publication No. WO 2017/106061, published June 22, 2017 by Macrogenics, Inc.

PCT Publication No. WO 2017/123557, published July 20, 2017 by Armo Biosciences, Inc.

PCT Publication No. WO 2017/132827, published August 10, 2017 by Innovent Biologics (Suzhou) Co., Ltd.

PCT Publication No. WO 2017/133540, published August 10, 2017 by Innovent Biologics (Suzhou) Co., Ltd.

PCT Publication No. WO 2018/112033, published June 21, 2018 by Harvard College.

PCT Publication No. WO 2019/157098, published August 15, 2019 by Advaxis, Inc.

PCT Publication No. WO 2020/138489, published July 2, 2020 by Shionogi & Co., Ltd.

Pianko MJ, Liu Y, Bagchi S, Lesokhin AM (2017) Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: a review. *Stem CellInvestig* 4:32.

Plitas G, Konopacki C, Wu K *et al.* (2016) Regulatory T cells exhibit distinct features in human breast cancer. *Immunity* 5:1122-34.

Saleh R. Elkord E (2020) FoxP3$^+$ T regulatory cells in cancer: prognostic biomarkers and therapeutic targets. *Cancer Lett* 490:174-85.

Scortegagna M, Hockemeyer K, Dolgalev I, Pozniak J, Rambow F *et al.* (2020) Siah2 control of T-regulatory cells limits anti-tumor immunity. *Nat Commun* doi: 10.1038/s41467-019-13826-7.

Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, Henning KA, Chen T, Srinivasan M *et al.* (2013) Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Res* 1(1):32-42.

Shah W, Yan X, Jing L, Zhou Y, Chen H, Wang Y (2011) A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4$^+$FOXP3$^+$ regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cell Mol Immunol* 8:59-66.

Sharma A, Subudhi SK, Blando J, Scutti J, Vence L, Wargo J, Allison JP *et al.* (2019a) Anti-CTLA-4 immunotherapy does not deplete FOXP3$^+$ regulatory T cells (Tregs) in human cancers. *Clin Cancer Res* 25(4):1233-8.

Sharma A, Subudhi SK, Blando J, Vence L, Wargo J, Allison JP *et al.* (2019b) Anti- CTLA-4 immunotherapy does not deplete foxp3$^+$ regulatory t cells (tregs) in human cancers - Response. *Clin Cancer Res* 25(11):3469-3470.

Shitara K, Nishikawa H (2018) Regulatory T cells: a potential target in cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 1417(1):104-15.

Siemers NO, Holloway JL, Chang H, Chasalow SD, Ross-MacDonald PB *et al.* (2017) Genome-wide association analysis identifies genetic correlates of immune infiltrates in solid tumors. PLoS ONE 12(7): e0179726.

Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F *et al.* (2013) Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* 210(9):1695-710.

Tao H, Mimura Y, Aoe K *et al.* (2012) Prognostic potential of FOXP3 expression in nonsmall cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer* 75:95-101.

Teng MWL, Ngiow SF, von Scheidt B, McLaughlin N, Sparwasser T, Smyth MJ (2010) Conditional regulatory T-cell depletion releases

adaptive immunity preventing carcinogenesis and suppressing established tumor growth. *Cancer Research* 70(20):7800-9.

Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH (1995) Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3(5):541-7.

U.S. Patent No. 6,808,710, issued October 26, 2004 to Wood *et al.*

U.S. Patent No. 7,488,802, issued February 10, 2009 to Collins *et al.*

U.S. Patent No. 7,943,743, issued May 17, 2011 to Korman *et al.*

U.S. Patent No. 7,767,429, issued August 3, 2010 to Bookbinder *et al.*

U.S. Patent No. 8,008,449, issued August 30, 2011 to Korman *et al.*

U.S. Patent No. 8,168,757, issued May 1, 2012 to Finnefrock *et al.*

U.S. Patent No. 8,217,149, issued July 10, 2012 to Irving *et al.*

U.S. Patent No. 8,354,509, issued January 15, 2013 to Carven *et al.*

U.S. Patent No. 8,779,108, issued July 15, 2014 to Queva *et al.*

U.S. Patent No. 9,175,082, issued November 3, 2015 to Zhou *et al.*

U.S. Patent No. 9,205,148, issued December 3, 2015 to Langermann *et al.*

U.S. Patent No. 9,624,298, issued April 18, 2017 to Nastri *et al.*

U.S. Patent No. 10,087,259, issued October 2, 2018 to Rudenski and Plitas

U.S. Patent No. 10,550,191, issued February 4, 2020 to Yoshida *et*

al.

U.S. Publication No. 2004/0110704, published June 10, 2004 by Yamane *et al.*

U.S. Publication No. 2015/0079109, published March 19, 2015 by Li *et al.*

U.S. Publication No. 2016/0272708, published September 22, 2016 by Chen *et al.*

Vila-Caballer M, Gonzalez-Granado JM, Zorita V, Abu Nabah YN, Silvestre-Roig C *et al.* (2019) Disruption of the CCL1-CCR8 axis inhibits vascular Treg recruitment and function and promotes atherosclerosis in mice. *JMol Cell Cardiol* 132:154-63.

Wang C, Thudium KB, Han M, Wang XT *et al.* (2014) *In vitro* characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and *in vivo* toxicology in non-human primates. *Cancer Imm Res* 2(9):846-56.

Wang DD, Zhang S, Zhao H, Men AY, Parivar K (2009) Fixed dosing versus body size- based dosing of monoclonal antibodies in adult clinical trials. *J Clin Pharmacol* 49:1012-24.

Wang L, Simons DL, Lu X *et al.* (2019) Connecting blood and intratumoral Treg cell activity in predicting future relapse in breast cancer. *Nature Immunol* 20:1220-30.

Wang S, Liu X (2019). The UCSCXenaTools R package: a toolkit for accessing genomics data from UCSC Xena platform, from cancer multi-omics to single-cell RNA-seq. *J Open Source Software* 4(40): 1627,

https://doi.org/10.21105/joss.01627.

Weber J (2010) Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer- preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade. *Semin Oncol* 37(5): 430-9.

Wolchok JD, Weber JS, Maio M, Neyns B, Harmankaya K *et al.* (2013) Four-year survival rates for patients with metastatic melanoma who received ipilimumab in phase II clinical trials. *Ann Oncol* 24(8):2174-80.

Wu TT, Kabat EA (1970) An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 132:211-250.

Xu K, He J, Zhang J, Liu T, Yang F, Ren T (2020) A novel prognostic risk score model based on immune-related genes in patients with stage IV colorectal cancer. *Biosci Rep* 40(10):BSR20201725.

Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S *et al.* (2004) Crucial role of *FOXP3* in the development and function of human $CD25^+$ $CD4^+$ regulatory T cells. *Int Immunol* 16(11):1643-56.

Yamane-Ohnuki N, Kinoshita S, Inoue-Urakubo M, Kusunoki M, Iida S *et al.* (2004) Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody- dependent cellular cytotoxicity. *BiotechnolBioeng* 87: 614-22.

Yao S, Zhu Y, Chen L (2013) Advances in targeting cell surface

signalling molecules for immune modulation. *Nature Rev Drug Discov* 12:130-46.

Yi J, Jiang S-J. (2018) Dysregulation of CCL18/CCR8 axis predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. *Eur J Inflamm* 16: 1-7.

Zhang F, Wei H, Wang X, Bai Y, Wang P *et al.* (2017) Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade. *Cell Discov* 3:17004.

Zhao S, Jiang T, Zhang L, Yang H, Liu X *et al.* (2016) Clinicopathological and prognostic significance of regulatory T cells in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Oncotarget* 7:36065-73.

Zheng C, Zheng L, Yoo JK, Guo H, Zhang Y *et al.* (2017) Landscape of infiltrating T cells in liver cancer revealed by single-cell sequencing. *Cell* 169(7):1342-56.

Zhu JZ, Millard CJ, Ludeman JP, Simpson LS, Clayton DJ *et al.* (2011) Tyrosine sulfation influences the chemokine binding selectivity of peptides derived from chemokine receptor CCR3. *Biochemistry* 50:1524-34.

【序列表】

<110> 美商必治妥美雅史谷比公司(Bristol Myers Squibb)

<120> 用於治療癌症之抗CCR8抗體

<130> 13358-TW-NP

<150> 62/993570
<151> 2020-03-23

<150> 63/157618
<151> 2021-03-05

<150> 63/041992
<151> 2020-06-21

<160> 120

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 355
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Met Asp Tyr Thr Leu Asp Leu Ser Val Thr Thr Val Thr Asp Tyr Tyr
1 5 10 15

Tyr Pro Asp Ile Phe Ser Ser Pro Cys Asp Ala Glu Leu Ile Gln Thr
20 25 30

Asn Gly Lys Leu Leu Leu Ala Val Phe Tyr Cys Leu Leu Phe Val Phe
35 40 45

Ser Leu Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Leu Val Leu Val Val Cys Lys
50 55 60

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

Asp Leu Leu Phe Val Phe Ser Phe Pro Phe Gln Thr Tyr Tyr Leu Leu

85 90 95

Asp Gln Trp Val Phe Gly Thr Val Met Cys Lys Val Val Ser Gly Phe
100 105 110

Tyr Tyr Ile Gly Phe Tyr Ser Ser Met Phe Phe Ile Thr Leu Met Ser
115 120 125

Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Val His Ala Val Tyr Ala Leu Lys Val
130 135 140

Arg Thr Ile Arg Met Gly Thr Thr Leu Cys Leu Ala Val Trp Leu Thr
145 150 155 160

Ala Ile Met Ala Thr Ile Pro Leu Leu Val Phe Tyr Gln Val Ala Ser
165 170 175

Glu Asp Gly Val Leu Gln Cys Tyr Ser Phe Tyr Asn Gln Gln Thr Leu
180 185 190

Lys Trp Lys Ile Phe Thr Asn Phe Lys Met Asn Ile Leu Gly Leu Leu
195 200 205

Ile Pro Phe Thr Ile Phe Met Phe Cys Tyr Ile Lys Ile Leu His Gln
210 215 220

Leu Lys Arg Cys Gln Asn His Asn Lys Thr Lys Ala Ile Arg Leu Val
225 230 235 240

Leu Ile Val Val Ile Ala Ser Leu Leu Phe Trp Val Pro Phe Asn Val
245 250 255

Val Leu Phe Leu Thr Ser Leu His Ser Met His Ile Leu Asp Gly Cys
260 265 270

Ser Ile Ser Gln Gln Leu Thr Tyr Ala Thr His Val Thr Glu Ile Ile
275 280 285

Ser Phe Thr His Cys Cys Val Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Val Gly
290 295 300

Glu Lys Phe Lys Lys His Leu Ser Glu Ile Phe Gln Lys Ser Cys Ser
305 310 315 320

Gln Ile Phe Asn Tyr Leu Gly Arg Gln Met Pro Arg Glu Ser Cys Glu
325 330 335

Lys Ser Ser Ser Cys Gln Gln His Ser Ser Arg Ser Ser Ser Val Asp
340 345 350

Tyr Ile Leu
355

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Tyr Tyr Tyr Pro Asp Ile Phe
1 5

<210> 3
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Val Arg Arg Leu Lys Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Phe Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Arg Phe Asn Pro Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Lys Met
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Val Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Gly Tyr Ser Asp Leu Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 115
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Ile Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Gly Leu Arg Arg Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 6

<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser
20 25 30

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

Gly Ala Ile Gln Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Arg Arg Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe

20 25 30

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

Ser His Ile Ser Arg Gly Gly Thr Thr Ile Asn His Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Arg Leu Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

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

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

Asp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Asn Gly Asn Lys His His Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Arg Gln Gly Val Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Ala
20 25 30

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Thr
50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met His Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Val Val Thr Met Val Arg Gly Val Leu Tyr Asp Phe Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Gly Ile Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Val Pro Asn Trp Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Trp Lys Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Leu
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr His Ser Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly Glu Leu Gly Ile Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn
20 25 30

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

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

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

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

85 90 95

Ala Arg Arg Trp Arg Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Gly Ser Asn Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Arg Arg Pro Ser Gly Glu Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

His Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 17
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Arg Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 18
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 19
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser His
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Ser Tyr Ser Leu Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 24
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Arg Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Thr
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Thr Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Asn Met Asn
1 5 10

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Thr Thr Ile Ala His Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

Arg Leu Lys Gly Ser Phe Asp Tyr
1 5

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

Gly Phe Arg Phe Asn Pro Tyr Ala Met Asn
1 5 10

<210> 34
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35

Tyr Ser Asp Leu Tyr Val Leu Asp Tyr
1 5

<210> 36
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 38

<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His
1 5 10

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40

Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41

Leu Arg Arg Phe Val Tyr
1 5

<210> 42
<211> 16
<212> PRT

<213> 智人

<400> 42

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr
1 5

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser Glu Met His
1 5 10

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46

Ala Ile Gln Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ala

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47

Arg Arg Arg Asn Phe Asp Tyr
1 5

<210> 48
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr
1 5

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Asn Met Ile
1 5 10

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52

His Ile Ser Arg Gly Gly Thr Thr Ile Asn His Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53

Arg Leu Gly Val Phe Asp Tyr
1 5

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 55
<211> 7

<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 57

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Asn
1 5 10

<210> 58
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 58

Tyr Ile Ser Ser Ser Asn Gly Asn Lys His His Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 59

Arg Gln Gly Val Phe Asp Ile
1 5

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 60

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 61

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 62

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 63

Gly Phe Thr Phe Ser Val Ala Trp Met His
1 5 10

<210> 64
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 64

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Thr Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 65
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 65

Val Thr Met Val Arg Gly Val Leu Tyr Asp Phe
1 5 10

<210> 66
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 66

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 67

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 68

<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 68

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Arg Thr
1 5

<210> 69
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 69

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His
1 5 10

<210> 70
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 70

Ile Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 71

Val Pro Asn Trp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 72
<211> 11
<212> PRT

<213> 智人

<400> 72

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser His Leu His
1 5 10

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 74

His Gln Ser Tyr Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 75

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Asn Met Ile
1 5 10

<210> 76
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 76

Tyr Ile Ser Ser Ser Arg Ser Ile Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 77

Arg Trp Lys Gly Val Phe Asp Tyr
1 5

<210> 78
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 78

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 79

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 80

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 81

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met His
1 5 10

<210> 82
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 82

Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr His Ser Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10

<210> 83
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 83

Arg Gly Glu Leu Gly Ile Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 84
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 84

Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 85

Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 86

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 87
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 87

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn Asn Met Ile
1 5 10

<210> 88
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 88

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 89
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 89

Arg Trp Arg Gly Val Phe Asp Tyr

1 5

<210> 90
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 90

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 91

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 92

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 93
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 93

Gly Phe Ser Phe Arg Ser Tyr Gly Ile His
1 5 10

<210> 94
<211> 17
<212> PRT

<213> 智人

<400> 94

Val Ile Ser Tyr Glu Gly Ser Asn Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 95
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 95

Gly Arg Arg Pro Ser Gly Glu Gly Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 96
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 96

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 97

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 98

Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 99
<211> 447
<212> PRT
<213> 智人

<400> 99

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

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

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

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

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

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

Val Arg Arg Leu Lys Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 100
<211> 450
<212> PRT
<213> 智人

<400> 100

Glu Val Gln Leu Val Glu Phe Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Arg Phe Asn Pro Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Lys Met
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Val Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Gly Tyr Ser Asp Leu Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

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

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 101
<211> 445

<212> PRT
<213> 智人

<400> 101

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

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

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

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

Lys Gly Lys Ala Ile Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Thr Gly Leu Arg Arg Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr
            100                 105                 110

Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
        115                 120                 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    130                 135                 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145                 150                 155                 160

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

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
```

180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

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

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

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

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

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

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

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

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

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

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 102
<211> 445
<212> PRT
<213> 智人

<400> 102

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser
20 25 30

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

Gly Ala Ile Gln Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Arg Arg Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

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

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

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 103
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 103

Gly Phe Arg Phe Gly Pro Tyr Ala Met Asn
1 5 10

<210> 104
<211> 19
<212> PRT

<213> 智人

<400> 104

Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 105

Tyr Ser Asp Leu Tyr Val Leu Asp Tyr
1 5

<210> 106
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 106

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 107
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 107

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 108

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 109
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 109

Val Thr Asp Tyr Tyr Tyr Pro Asp Ile Phe Ser
1 5 10

<210> 110
<211> 451
<212> PRT
<213> 智人

<400> 110

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Gly Ser Asn Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Arg Arg Pro Ser Gly Glu Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

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

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

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

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

```
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
                325                 330                 335

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
    450
```

<210> 111
<211> 214
<212> PRT
<213> 智人

<400> 111

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
```

210

<210> 112
<211> 219
<212> PRT
<213> 智人

<400> 112

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

His Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 113
<211> 219
<212> PRT
<213> 智人

<400> 113

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Arg Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Ser Gly Tyr Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 114
<211> 219
<212> PRT
<213> 智人

<400> 114

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 115
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 115

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Phe Gly Pro Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Gly Tyr Ser Asp Leu Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 116
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 116

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Pro Ser Leu Pro Val Asn Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Gln Gly Asn Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Trp Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 117
<211> 449
<212> PRT
<213> 智人

<400> 117

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Phe Gly Pro Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Gly Tyr Ser Asp Leu Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

Gly

<210> 118
<211> 219
<212> PRT
<213> 智人

<400> 118

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Pro Ser Leu Pro Val Asn Pro Gly
1 5 10 15

```
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

Gln Gly Asn Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Trp Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
                85                  90                  95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
            100                 105                 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                165                 170                 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 119
<211> 214
<212> PRT
<213> 智人

<400> 119

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
```

165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 120
<211> 353
<212> PRT
<213> 智人

<400> 120

Met Asp Tyr Thr Met Glu Pro Asn Val Thr Met Thr Asp Tyr Tyr Pro
1 5 10 15

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

Met Leu Tyr Leu Ala Ile Leu Tyr Cys Val Leu Phe Val Leu Gly Leu
35 40 45

Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Leu Val Leu Val Gly Cys Lys Lys Leu
50 55 60

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

Leu Phe Val Leu Ser Ile Pro Phe Gln Thr His Asn Leu Leu Asp Gln
85 90 95

Trp Val Phe Gly Thr Ala Met Cys Lys Val Val Ser Gly Leu Tyr Tyr
100 105 110

Ile Gly Phe Phe Ser Ser Met Phe Phe Ile Thr Leu Met Ser Val Asp
115 120 125

Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Tyr Ala Ile Lys Val Arg Thr
130 135 140

Ala Ser Val Gly Thr Ala Leu Ser Leu Thr Val Trp Leu Ala Ala Val
145 150 155 160

Thr Ala Thr Ile Pro Leu Met Val Phe Tyr Gln Val Ala Ser Glu Asp
165 170 175

Gly Met Leu Gln Cys Phe Gln Phe Tyr Glu Glu Gln Ser Leu Arg Trp
180 185 190

Lys Leu Phe Thr His Phe Glu Ile Asn Ala Leu Gly Leu Leu Leu Pro
195 200 205

Phe Ala Ile Leu Leu Phe Cys Tyr Val Arg Ile Leu Gln Gln Leu Arg
210 215 220

Gly Cys Leu Asn His Asn Arg Thr Arg Ala Ile Lys Leu Val Leu Thr
225 230 235 240

Val Val Ile Val Ser Leu Leu Phe Trp Val Pro Phe Asn Val Ala Leu
245 250 255

Phe Leu Thr Ser Leu His Asp Leu His Ile Leu Asp Gly Cys Ala Thr
260 265 270

Arg Gln Arg Leu Ala Leu Ala Ile His Val Thr Glu Val Ile Ser Phe
275 280 285

Thr His Cys Cys Val Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Glu Lys
290 295 300

Phe Lys Lys His Leu Met Asp Val Phe Gln Lys Ser Cys Ser His Ile
305 310 315 320

Phe Leu Tyr Leu Gly Arg Gln Met Pro Val Gly Ala Leu Glu Arg Gln
325 330 335

Leu Ser Ser Asn Gln Arg Ser Ser His Ser Ser Thr Leu Asp Asp Ile
340 345 350

Leu

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種單株抗體或其抗原結合部分，其特異性結合於表現於細胞表面上之C-C模體趨化介素受體8 (CCR8)且藉由抗體依賴性細胞毒性(ADCC)來介導CCR8表現細胞之消耗。

【請求項2】

如請求項1之單株抗體或其抗原結合部分，其特異性結合於人類CCR8 (hCCR8)，該人類CCR8之序列係如SEQ ID NO:1所闡述。

【請求項3】

如請求項1或2之單株抗體或其抗原結合部分，其包含具有人類IgG1或IgG3同型之重鏈恆定區。

【請求項4】

一種包含經修飾之重鏈恆定區之經修飾之抗hCCR8單株抗體或其抗原結合部分，其與如前述請求項中任一項之單株抗體或其抗原結合部分相比以更高的親和力結合於Fcγ受體(FcγR)且介導增強之ADCC，視情況地，其至少介導：

(a) 增強2倍之ADCC活性；

(b) 增強5倍之ADCC活性；或

(c) 增強10倍之ADCC活性；

如藉由實例17中所描述之NK細胞溶解分析法中的細胞溶解之EC_{50}之降低所量測。

【請求項5】

如請求項4之經修飾之抗hCCR8單株抗體或其抗原結合部分，其包含

呈現降低之岩藻醣基化之經修飾之IgG1重鏈恆定區，視情況包含低岩藻醣基化或未經岩藻醣基化之經修飾之IgG1重鏈恆定區。

【請求項6】

如請求項4或5之經修飾之抗hCCR8單株抗體或其抗原結合部分，其包含經修飾之IgG1重鏈恆定區，該重鏈恆定區含有介導增強之ADCC之一個突變或多個突變，視情況其中該突變或該多個突變係選自G236A；S239D；F243L；E333A；G236A/I332E；S239D/I332E；S267E/H268F；S267E/S324T；H268F/S324T；G236A/S239D/I332E；S239D/A330L/I332E；S267E/H268F/S324T；及G236A/S239D/A330L/I332E。

【請求項7】

如前述請求項中任一項之單株抗體或其抗原結合部分，其

(i) 以如藉由實例11中所描述之結合分析法所量測之以下EC_{50}特異性結合於表現人類CCR8之中國倉鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary；CHO)細胞：

(a) 約10 nM或更低；

(b) 約5 nM或更低；

(c) 約1.7 nM或更低；

(d) 約1 nM或更低；

(e) 約0.5 nM或更低；

(f) 約0.1 nM或更低；

(g) 約0.1 nM；

(h) 約1.7 nM；

(i) 約0.1 nM與約10 nM之間；

(j) 約0.1 nM與約2 nM之間；

(k) 約0.5 nM與約5 nM之間；

(l) 約1 nM與約2 nM之間；或

(m) 約0.5 nM與約1 nM之間；

及/或

(ii) 以如藉由實例11中所描述之結合分析法所量測之以下EC_{50}特異性結合於經活化之調節性T細胞(Treg)：

(a) 約50 nM或更低；

(b) 約14 nM或更低；

(c) 約5 nM或更低；

(d) 約2 nM或更低；

(e) 約0.5 nM或更低；

(f) 約0.3 nM或更低；

(g) 約0.1 nM或更低；

(h) 約0.03 nM或更低；

(i) 約1.7 nM；

(j) 約0.03 nM與約10 nM之間；

(k) 約0.1 nM與約5 nM之間；或

(l) 約0.2 nM與約2 nM之間；

及/或

(iii) 以如藉由實例11中所描述之表面電漿子共振(SPR)所量測之以下K_D結合於包含硫酸化酪胺酸-15及酪胺酸-17殘基之人類CCR8之N

端肽：

(a) 約100 nM或更低；

(b) 約50 nM或更低；

(c) 約10 nM或更低；

(d) 約5 nM或更低；

(e) 約1.6 nM；

(f) 約1.0 nM或更低；

(g) 約0.5 nM或更低；

(h) 約0.1 nM或更低；

(i) 約100 nM與約0.1 nM之間；

(j) 約50 nM與約0.5 nM之間；

(k) 約10 nM與約1 nM之間；或

(l) 約2 nM與約1 nM之間；

及/或

(iv) 以如藉由實例11中所描述之SPR所量測之以下K_D結合於包含單硫酸化殘基(酪胺酸-15)之人類CCR8之N端肽：

(a) 約100 nM或更低；

(b) 約50 nM或更低；

(c) 約25 nM或更低；

(d) 約10 nM或更低；

(e) 約1.0 nM或更低；

(f) 約20 nM；

(i) 約100 nM與約1 nM之間；

(j) 約50 nM與約10 nM之間；或

(k) 約30 nM與約20 nM之間。

【請求項8】

如前述請求項中任一項之單株抗體或其抗原結合部分，其特異性結合於胸腺之髓質及皮膚之真皮中的稀少及分散的免疫細胞，但不結合於人類大腦、小腦、心臟、肝臟、肺、腎臟、扁桃體、脾、胸腺、結腸、胃、胰臟、腎上腺、垂體、皮膚、周邊神經、睪丸或子宮組織或周邊血液單核細胞(PBMC)。

【請求項9】

如前述請求項中任一項之單株抗體或其抗原結合部分，其進一步抑制C-C模體趨化介素配位體1 (CCL1)與CCR8之結合且抑制CCR8/CCL1信號傳導，如藉由實例15中所描述之鈣通量之抑制所量測。

【請求項10】

如前述請求項之單株抗體或其抗原結合部分，其

(i) 以下列IC_{50}抑制CCR8/CCL1信號傳導：

(a) 約10 nM或更低；

(b) 約5 nM或更低；

(c) 約1 nM或更低；

(d) 約0.5 nM或更低；

(e) 約0.1 nM或更低；

(f) 約0.01 nM或更低；

(g) 約0.01 nM與約10 nM之間；

(h) 約0.05 nM與約5 nM之間；

(i) 約0.1 nM與約1 nM之間；或

(j) 約0.46 nM；

及/或

(ii) 以如藉由實例17中所描述之CD16交聯分析法所量測之以下EC_{50}介導CCR8表現細胞之消耗：

(a) 約100 pM或更低；

(b) 約30 pM或更低；

(c) 約10 pM或更低；

(d) 約3 pM或更低；

(e) 約1 pM或更低；

(f) 約0.5 pM或更低；

(g) 約0.1 pM或更低；

(h) 約0.05 pM或更低；

(i) 約0.7 pM；

(j) 在約0.05 pM與約50 pM之間；

(k) 在約0.1 pM與約10 nM之間；

(l) 在約0.3 nM與約7 nM之間；或

(m) 在約0.6 nM與約3 nM之間；

及/或

(iii) 以如藉由實例19中所描述之細胞凋亡分析法所量測之以下EC_{50}介導經活化之Treg之消耗：

(a) 約500 pM或更低；

(b) 約100 pM或更低；

(c) 約30 pM或更低；

(d) 約15 pM或更低；

(e) 約5 pM或更低；

(f) 約1 pM或更低；

(g) 約13 pM；

(h) 在約1 pM與約500 pM之間；

(i) 在約5 pM與約100 pM之間；或

(j) 在約10 pM與約50 pM之間。

【請求項11】

如前述請求項中任一項之單株抗體或其抗原結合部分，其結合於位於人類CCR8之N端域中之抗原決定基，如藉由X射線結晶學所測定，其中該抗原決定基包含具有序列$V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)之肽內的至少一個胺基酸，視情況其中

(i) 該抗原決定基包含具有序列$V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)之肽內的2、3、4、5、6、7、8、9、10個或所有胺基酸；視情況其中

(ii) 該抗原決定基包含具有序列$V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)之肽中的所有11個胺基酸；視情況其中

(iii) 胺基酸Y_{15}及Y_{17}皆經硫酸化。

【請求項12】

一種單株抗體或其抗原結合部分，其能夠介導ADCC且特異性結合於人類C-C模體趨化介素受體8 (hCCR8)上之抗原決定基，該人類C-C模體趨化介素受體8之序列係如SEQ ID NO:1所闡述，其中該抗原決定基位於

hCCR8之跨越約胺基酸殘基12至22之肽($V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$；SEQ ID NO:109)內之N端域中，如藉由X射線結晶學所測定，視情況其中：

(i) 該抗原決定基包含具有序列$V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$(SEQ ID NO:109)之肽內之至少一個胺基酸；

(ii) 該抗原決定基包含具有序列$V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$(SEQ ID NO:109)之肽內之2、3、4、5、6、7、8、9、10個或所有胺基酸；

(iii) 該抗原決定基包含具有序列$V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$(SEQ ID NO:109)之肽中之11個胺基酸；或

(iv) 該抗原決定基由具有序列$V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$(SEQ ID NO:109)之肽中之所有11個胺基酸組成。

【請求項13】

如前述請求項中任一項之單株抗體或其抗原結合部分，其中

(i) 當在存在或不存在交聯抗體之情況下結合於細胞表面上之CCR8時，該抗體或其部分不引起CCR8之內化；及/或

(ii) 該抗體或其部分活體外促進人類腫瘤相關Treg之消耗；及/或

(iii) 該抗體或其部分特異性誘導腫瘤Treg之消耗而不消耗非腫瘤組織中之$CCR8^+$ T細胞，視情況其中該非腫瘤組織為皮膚、胸腺、脾或血液；及/或

(iv) 當以單藥療法形式投與個體時，該抗體或其部分抑制該個體中之腫瘤細胞之生長；及/或

(v) 當與其他用於治療癌症之治療劑組合投與個體時，該抗體或其部

分抑制該個體中之腫瘤細胞之生長。

【請求項14】

如前述請求項中任一項之單株抗體或其抗原結合部分，其呈現以下特性中之至少一種、兩種、三種、四種、五種或六種：

(a) 以約2 nM或更低之EC_{50}特異性結合於表現於細胞表面上之CCR8；

(b) 特異性結合於胸腺之髓質及皮膚之真皮中之稀少及分散的免疫細胞，但不結合於人類大腦、小腦、心臟、肝臟、肺、腎臟、扁桃體、脾、胸腺、結腸、胃、胰臟、腎上腺、垂體、皮膚、周邊神經、睪丸或子宮組織或周邊血液單核細胞(PBMC)；

(c) 以約5 nM或更低之IC_{50}抑制CCL1與CCR8之結合及抑制CCR8/CCL1信號傳導；

(d) 當結合於細胞表面上之CCR8時，以約10 pM或更低之EC_{50}介導該細胞之消耗；

(e) 當在存在或不存在交聯抗體之情況下結合於細胞表面上之CCR8時，不引起CCR8之內化；

(f) 使用實例22中描述之分析法，活體外促進人類腫瘤相關Treg之消耗；

(g) 使用實例20中描述之分析法，促進離體人類腫瘤切片樣品中之人類腫瘤相關Treg之消耗；

(h) 特異性介導腫瘤Treg之消耗，同時避開非腫瘤組織中之$CCR8^+$ T細胞；

(i) 當以單藥療法形式投與個體時，抑制該個體中之腫瘤細胞之生

長；及

(j) 當與其他用於治療癌症之治療劑組合投與個體時，抑制該個體中之腫瘤細胞之生長；視情況其中該單株抗體或其抗原結合部分呈現所有該等特性。

【請求項15】

如請求項34或35之單株抗體或其抗原結合部分，其進一步以約10 nM或更低之K_D結合於位於人類CCR8之N端域中之抗原決定基，其中該抗原決定基包含肽，該肽具有序列$V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)以及硫酸化酪胺酸-15及酪胺酸-17殘基。

【請求項16】

一種包含經修飾之重鏈恆定區之經修飾之抗hCCR8單株抗體或其抗原結合部分，其與如請求項14或15之單株抗體或其抗原結合部分相比以更高的親和力結合於Fcγ受體(FcγR)且介導增強至少2、5或10倍之ADCC。

【請求項17】

如前述請求項中任一項之單株抗體或其抗原結合部分，其與參考抗體結合於相同抗原決定基，其中該參考抗體包含：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:3所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:15所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(c) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:5所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:17所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(d) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(e) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:7所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:19所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(f) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:8所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:20所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(g) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:9所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:21所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(h) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:10所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:22所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(i) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:11所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:23所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(j) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:12所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:24所闡述之序列的連續連接之胺

基酸；

(k) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:13所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:25所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(l) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:14所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:26所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(m) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【請求項18】

如前述請求項中任一項之單株抗體或其抗原結合部分，其與參考抗體交叉競爭結合於hCCR8，其中該參考抗體包含：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:3所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:15所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(c) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:5所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:17所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(d) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基

酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(e) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:7所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:19所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(f) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:8所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:20所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(g) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:9所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:21所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(h) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:10所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:22所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(i) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:11所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:23所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(j) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:12所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:24所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(k) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:13所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:25所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(l) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:14所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:26所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(m) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【請求項19】

如前述請求項中任一項之單株抗體或其抗原結合部分，其包含以下中之每一者中之CDR1、CDR2及CDR3域：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:3所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:15所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(c) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:5所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:17所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(d) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(e) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:7所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:19所闡述之序列的連續連接之胺基

酸；

(f) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:8所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:20所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(g) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:9所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:21所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(h) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:10所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:22所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(i) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:11所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:23所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(j) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:12所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:24所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(k) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:13所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:25所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(l) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:14所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:26所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(m) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之

胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【請求項20】

如請求項19之單株抗體或其抗原結合部分，其包含如藉由Kabat方法所定義之以下CDR域：

(a) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:27所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:28所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:29所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:30所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:31所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:32所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:33所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:34所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:35所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:36所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:37所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:38所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(c) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:39所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:40所闡

述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:41所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:42所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:43所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:44所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(d) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:45所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:46所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:47所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:48所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:49所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:50所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(e) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:51所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:52所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:53所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:54所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:55所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:56所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(f) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:57所闡述之序列的

連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:58所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:59所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:60所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:61所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:62所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(g) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:63所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:64所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:65所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:66所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:67所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:68所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(h) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:69所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:70所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:71所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:72所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:73所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:74所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(i) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:75所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:76所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:77所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:78所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:79所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:80所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(j) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:81所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:82所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:83所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:84所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:85所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:86所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(k) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:87所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:88所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:89所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:90所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:91所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:92所闡述之序列的連續連

接之胺基酸；

(l) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:93所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:94所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:95所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:96所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:97所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:98所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(m) 重鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:103所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:104所闡述之序列的連續連接之胺基酸；重鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:105所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:106所闡述之序列的連續連接之胺基酸；輕鏈可變區CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:107所闡述之序列的連續連接之胺基酸；及輕鏈可變區CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:108所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【請求項21】

如請求項19或20之單株抗體或其抗原結合部分，其包含：

(a) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:3所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:15所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:4所闡述之序列的連續連接之胺基

酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:16所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(c) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:5所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:17所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(d) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:6所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:18所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(e) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:7所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:19所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(f) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:8所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:20所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(g) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:9所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:21所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(h) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:10所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:22所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(i) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:11所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:23所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(j) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:12所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:24所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(k) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:13所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:25所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(l) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:14所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:26所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(m) V_H，其包含具有如SEQ ID NO:115所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及V_L，其包含具有如SEQ ID NO:116所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【請求項22】

如請求項20或21之單株抗體或其抗原結合部分，其包含：

(a) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:99所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:111所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(b) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:100所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:112所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(c) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:101所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:113所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(d) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:102所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:114所闡述之序列的連續連接之胺基酸；

(e) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:117所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:118所闡述之序列的連續連接之胺基酸；或

(f) 重鏈，其包含具有如SEQ ID NO:110所闡述之序列的連續連接之胺基酸，及輕鏈，其包含具有如SEQ ID NO:119所闡述之序列的連續連接之胺基酸。

【請求項23】

如前述請求項中任一項之單株抗體或其抗原結合部分，其為嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體或其片段。

【請求項24】

一種免疫結合物，其包含連接至細胞溶解劑之如前述請求項中任一項之單株抗體或其抗原結合部分，視情況其中該細胞溶解劑為細胞毒素或放射性同位素。

【請求項25】

一種雙特異性分子，其包含連接至結合域之如請求項1至23中任一項之單株抗體或其抗原結合部分，該結合域具有與該單株抗體或其抗原結合部分不同的結合特異性。

【請求項26】

一種組合物，其包含：

(a) 如請求項1至23中任一項之單株抗體或其抗原結合部分；

(b) 如請求項24之免疫結合物；或

(c) 如請求項25之雙特異性分子，

及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項27】

一種經分離之核酸，其編碼如請求項1至23中任一項之單株抗體或其抗原結合部分。

【請求項28】

一種表現載體，其包含如請求項27之核酸。

【請求項29】

一種宿主細胞，其包含如請求項28之表現載體。

【請求項30】

一種用於製備抗CCR8抗體或其抗原結合部分之方法，其包含在如請求項29之宿主細胞中表現該抗體或其抗原結合部分及自該宿主細胞分離該抗體或其抗原結合部分。

【請求項31】

一種用於治療罹患癌症之個體之方法，其包含向該個體投與治療有效量之如請求項1至23中任一項之單株抗體或其抗原結合部分、如請求項24之免疫結合物、如請求項25之雙特異性分子或如請求項26之醫藥組合物，使得該個體得到治療。

【請求項32】

一種用於抑制個體中之腫瘤細胞之生長之方法，其包含向個體投與治療有效量之如請求項1至23中任一項之單株抗體或其抗原結合部分、如請求項24之免疫結合物、如請求項25之雙特異性分子或如請求項26之醫

藥組合物，使得抑制該個體中之腫瘤細胞之生長。

【請求項33】

如請求項31或32之方法，其中該方法進一步包含向該個體投與治療有效量之其他用於治療癌症之治療劑，視情況其中該其他治療劑為降低免疫系統之抑制或增加免疫系統之刺激之化合物。

【請求項34】

如請求項31至33中任一項之方法，其中該個體為人類。

【請求項35】

如請求項31至34中任一項之方法，其中：

(a) 該癌症為實體腫瘤，視情況其中該實體腫瘤為：

(i) 選自以下之癌症：鱗狀細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)、鱗狀NSCLC、非鱗狀NSCLC、頭頸癌、乳癌、食道癌、胃癌、胃腸癌、小腸癌、肝癌、肝細胞癌瘤(HCC)、胰臟癌(PAC)、腎癌、腎細胞癌(RCC)、膀胱癌、尿道癌、輸尿管癌、大腸直腸癌(CRC)、結腸癌、結腸癌瘤、肛門區癌、子宮內膜癌、前列腺癌、纖維肉瘤、神經母細胞瘤、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、生殖細胞腫瘤、兒童肉瘤、鼻腔鼻竇自然殺手細胞、黑素瘤、皮膚癌、骨癌、子宮頸癌、子宮癌、子宮內膜癌、輸卵管癌、卵巢癌、子宮頸癌瘤、陰道癌、外陰癌、睪丸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、陰莖癌、腎盂癌瘤、中樞神經系統(CNS)之贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、腫瘤血管生成、脊椎軸腫瘤、腦癌、腦幹神經膠質瘤、垂體腺瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮樣癌症、鱗狀細胞癌症、兒童實體腫瘤、

環境誘導之癌症、病毒相關癌症、病毒性來源癌症、晚期癌症、不可切除性癌症、轉移性癌症、難治性癌症、復發性癌症及其任何組合；或

(ii) 選自以下之癌症：非小細胞肺癌(NSCLC)、頭部及頸部之鱗狀細胞癌(SCCHN)、大腸直腸癌(CRC)、胃癌、胃食道(GE)接合區癌症及子宮頸癌；或

(iii) 選自以下之癌症：頭頸部鱗狀細胞癌(HNSC)、肺腺癌(LUAD)、胃腺癌(STAD)、肺鱗狀細胞癌(LUSC)、胰臟腺癌(PAAD)、直腸腺癌(READ)、食道癌(ESCA)、乳房侵襲性癌(BRCA)、結腸腺癌(COAD)以及子宮頸鱗狀細胞癌及子宮頸內腺癌(CESC)；或

(iv) 選自以下之癌症：頭部及頸部之鱗狀細胞癌(SCCHN)、子宮頸癌、大腸直腸癌(CRC)、非小細胞肺癌-鱗狀細胞癌(NSCLC-SCC)、NSCLC-腺癌(NSCLC-ADC)、胰臟癌、胃癌、膀胱癌及乳癌；或

(v) 選自以下之癌症：結腸腺癌、膀胱癌、乳癌及纖維肉瘤；或

(b) 該癌症為惡性血液病或該等腫瘤細胞為惡性血液病之細胞，視情況其中該惡性血液病係選自急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、T細胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma；HL)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、多發性骨髓瘤、鬱積型骨髓瘤、意義不明單株伽瑪球蛋白症(MGUS)、晚期、轉移性、難治性及/或復發性血液惡性病，以及該等血液惡性病之任何組合。

【請求項36】

如請求項31之方法，其中該其他治療劑為：

(a) 拮抗劑，其特異性結合於計劃性死亡-1 (PD-1)、計劃性死亡配位體-1 (PD-L1)、細胞毒性T淋巴細胞抗原-4 (CTLA-4)、淋巴細胞活化基因-3 (LAG-3)、B及T淋巴細胞弱化子(BTLA)、T細胞免疫球蛋白及黏蛋白域-3 (TIM-3)、殺手免疫球蛋白樣受體(KIR)、殺手細胞凝集素樣受體G1 (KLRG-1)、腺苷A2a受體(A2aR)、具有Ig及ITIM域之T細胞免疫受體(TIGIT)、T細胞活化之V域Ig抑制因子(VISTA)、原癌基因酪胺酸-蛋白質激酶MER (MerTK)、自然殺手細胞受體2B4 (CD244)或CD160；或

(b) 促效劑，其特異性結合於可誘導之T細胞共刺激劑(ICOS)、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40)、CD27、糖皮質素誘導之TNFR相關蛋白(GITR)或疱疹病毒侵入介體(HVEM)；及視情況其中：

(i) 該特異性結合於PD-1之拮抗劑係選自尼沃單抗(nivolumab)、派立珠單抗(pembrolizumab)、測米匹單抗(cemiplimab)、斯巴達珠單抗(spartalizumab)、卡瑞利珠單抗(camrelizumab)、斯迪利單抗(sintilimab)、緹勒珠單抗(tislelizumab)及特瑞普利單抗(toripalimab)；或

(ii) 該特異性結合於PD-L1之拮抗劑係選自阿特珠單抗(atezolizumab)、德瓦魯單抗(durvalumab)、艾維路單抗(avelumab)、恩沃利單抗(envafolimab)、BMS-936559、CK-301、CS-1001、SHR-1316、CBT-502及BGB-A333；或

(iii) 該特異性結合於CTLA-4之拮抗劑為伊派利單抗(ipilimumab)或曲美木單抗(tremelimumab)。

【請求項37】

一種用於增強罹患癌症之個體中的由治療劑引發之抗腫瘤免疫反應之方法，其包含向該個體投與治療有效量之如請求項1至23中任一項之單株抗體或其抗原結合部分、如請求項24之免疫結合物、如請求項25之雙特異性分子或如請求項26之醫藥組合物，使得該個體經歷比由單獨的該治療劑所引發之免疫反應更強的針對該癌症之免疫反應。

【請求項38】

如請求項37之方法，其中該治療劑為免疫檢查點抑制劑或放射線療法，視情況其中該檢查點抑制劑為抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4抗體。

【請求項39】

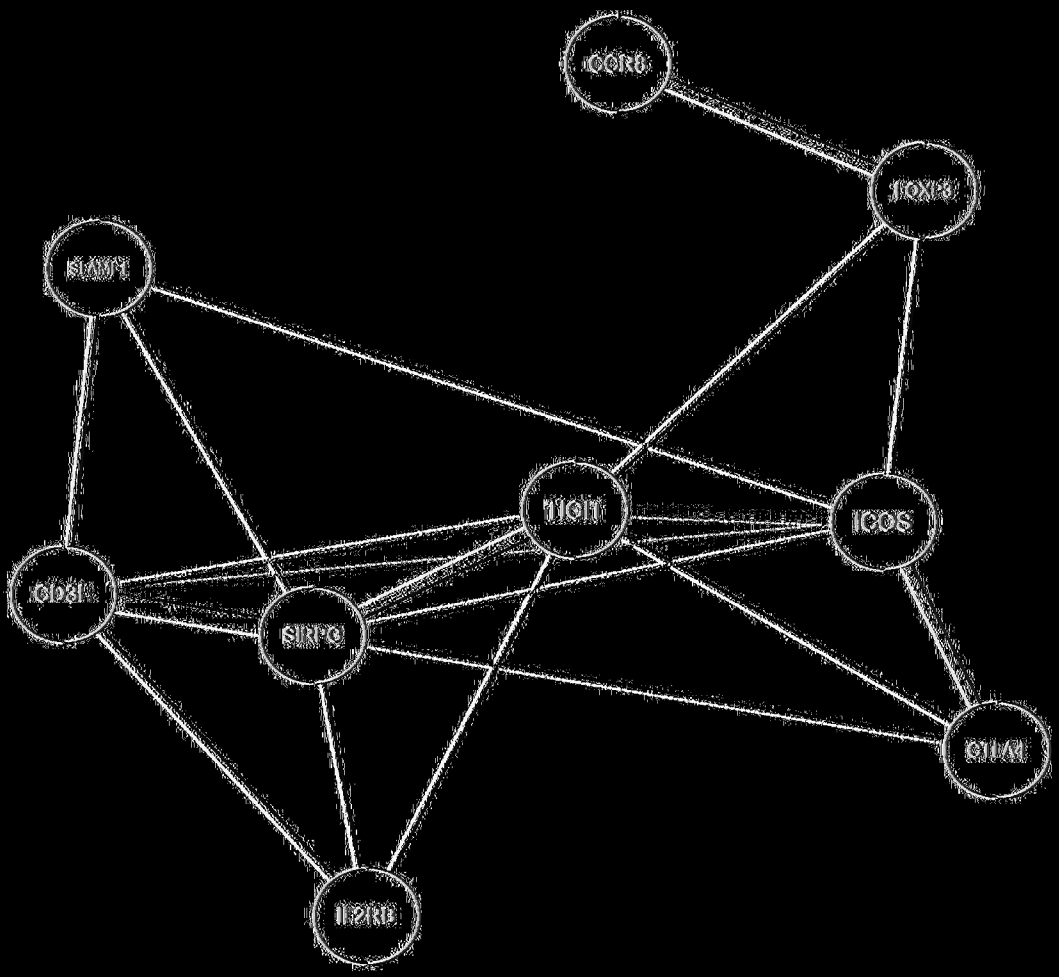
一種用於治療罹患癌症之個體之套組，該套組包含：

(a) 在約0.01至約20毫克/公斤體重範圍內之一或多個劑量之單株抗體或其抗原結合部分，該單株抗體或其抗原結合部分特異性結合於C-C模體趨化介素受體8 (CCR8)且藉由ADCC介導CCR8表現細胞之消耗；

(b) 視情況地，在約200至約1600 mg範圍內之一或多個劑量之單株抗體或其抗原結合部分，該單株抗體或其抗原結合部分特異性結合於PD-1、PD-L1或CTLA-4；及

(c) 在如請求項31至36中任一項之方法中使用該特異性結合於CCR8之單株抗體或其部分，及視情況地，該特異性結合於PD-1、PD-L1或CTLA-4之單株抗體或其部分之說明。

【發明圖式】



【圖1A】

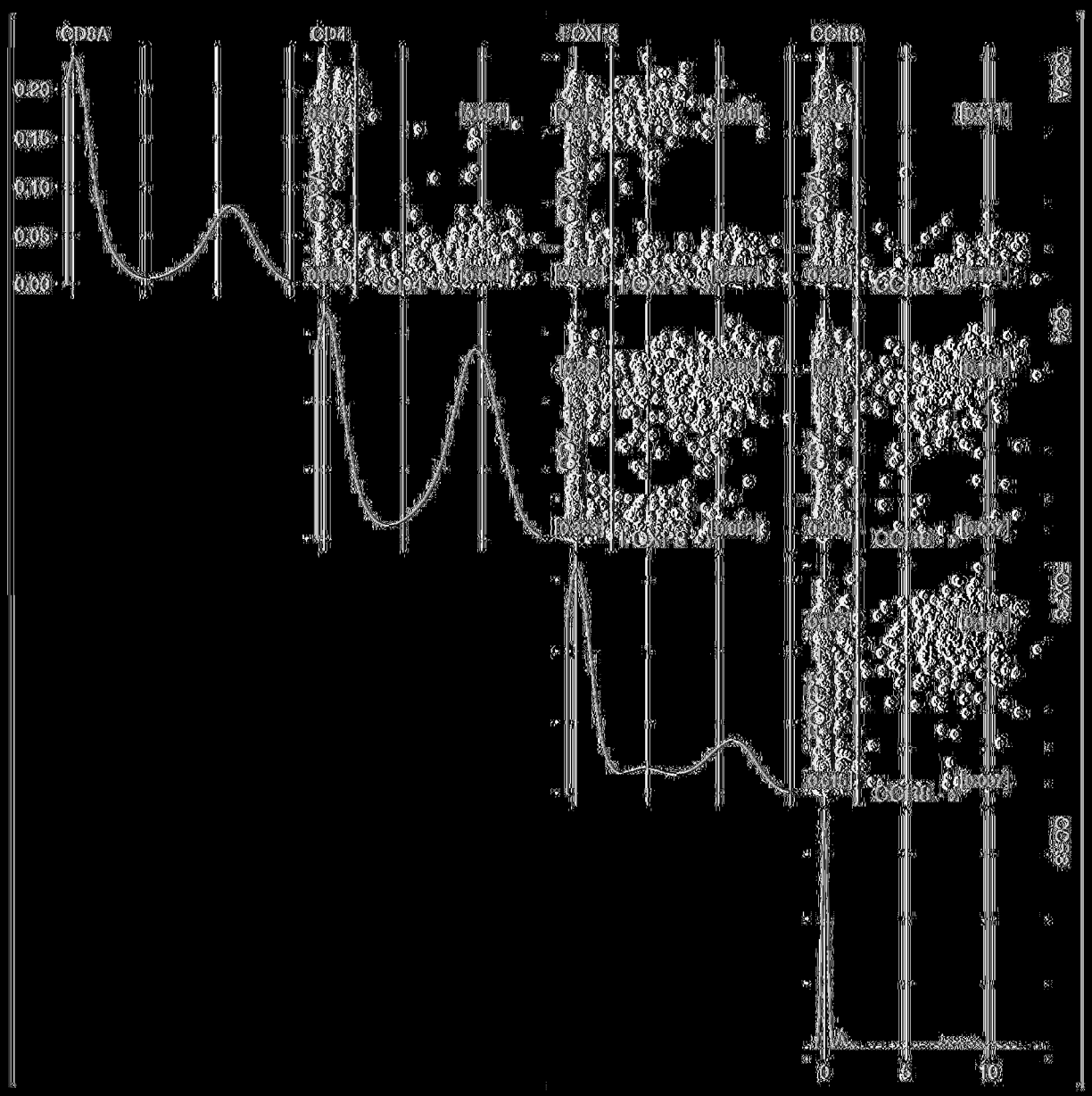


圖1B

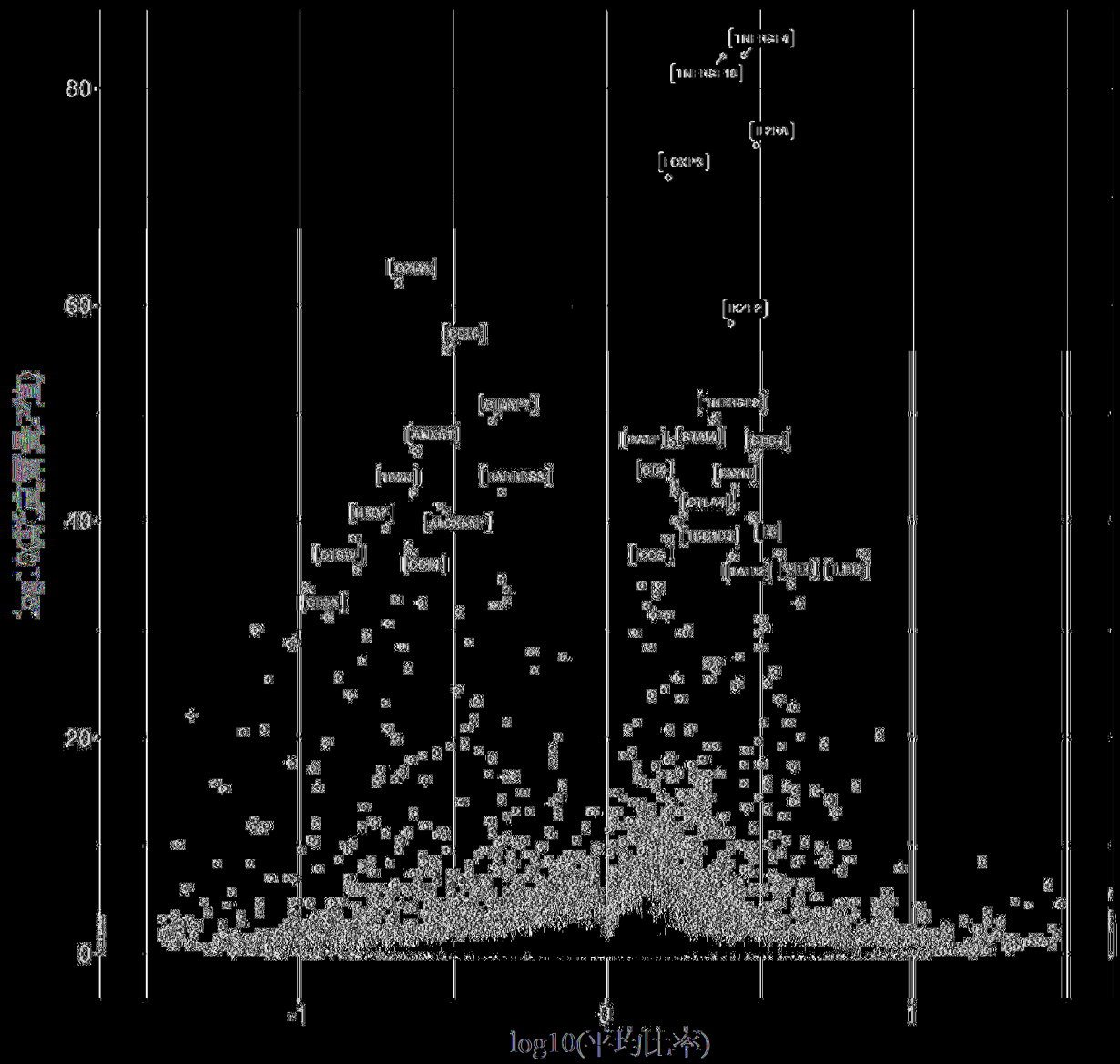
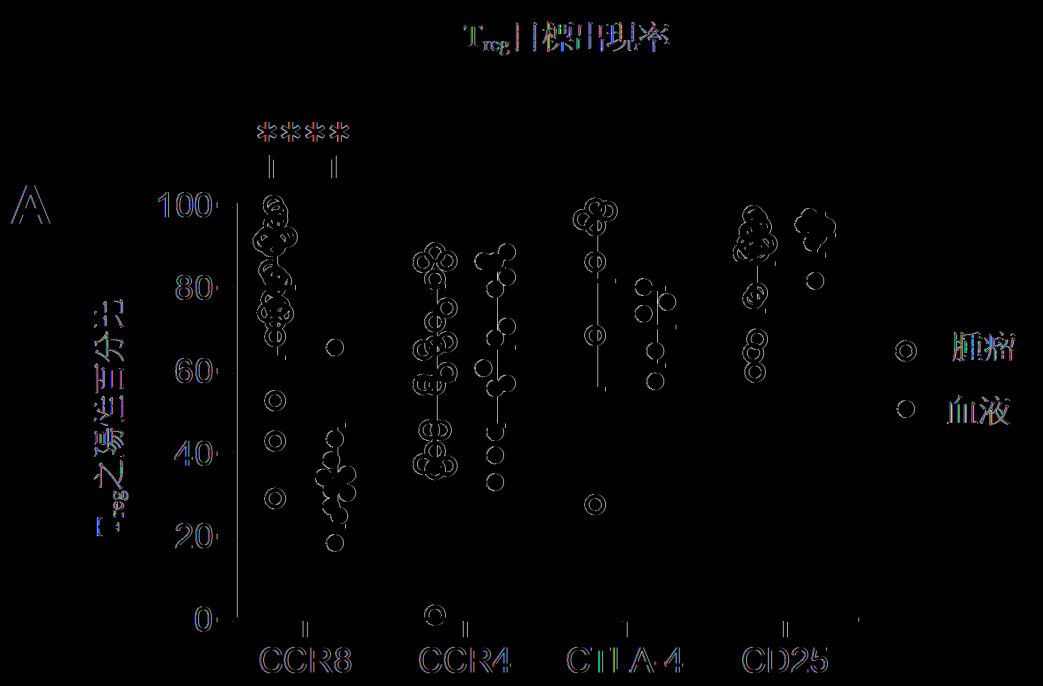


圖1C


Treg上標出現率
A
100
80
60
40
20
0
CCR8
CCR4
CTLA-4
CD25
腫瘤
血液

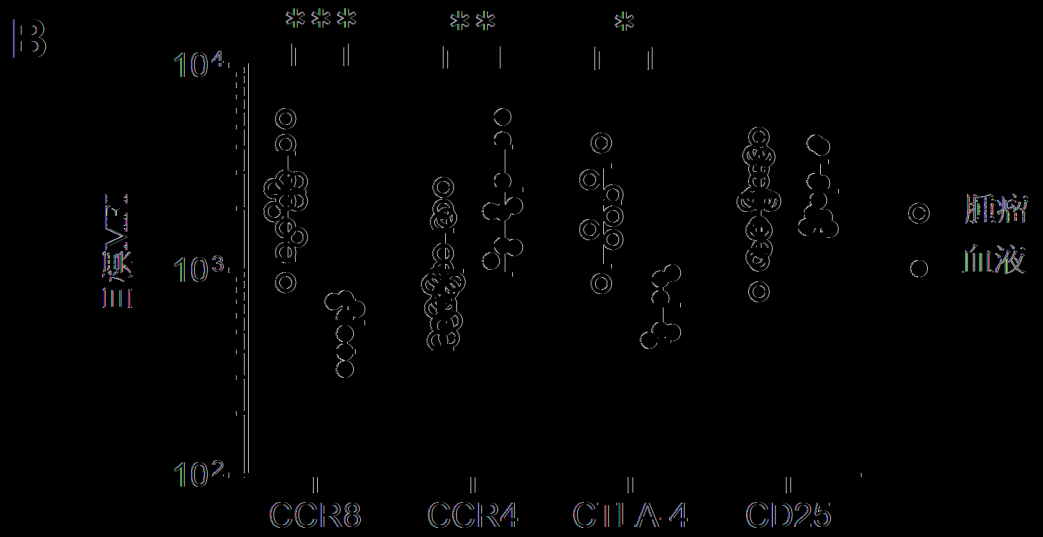
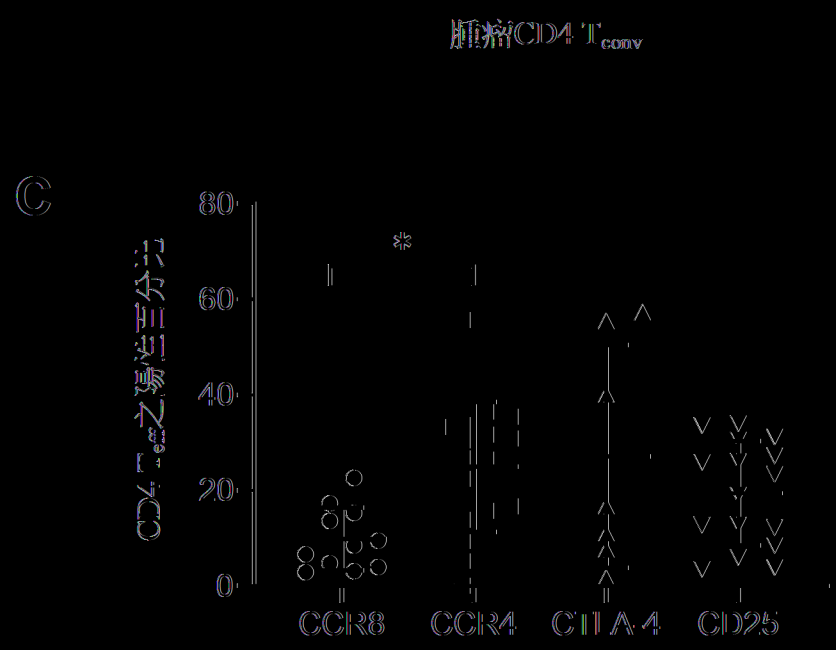
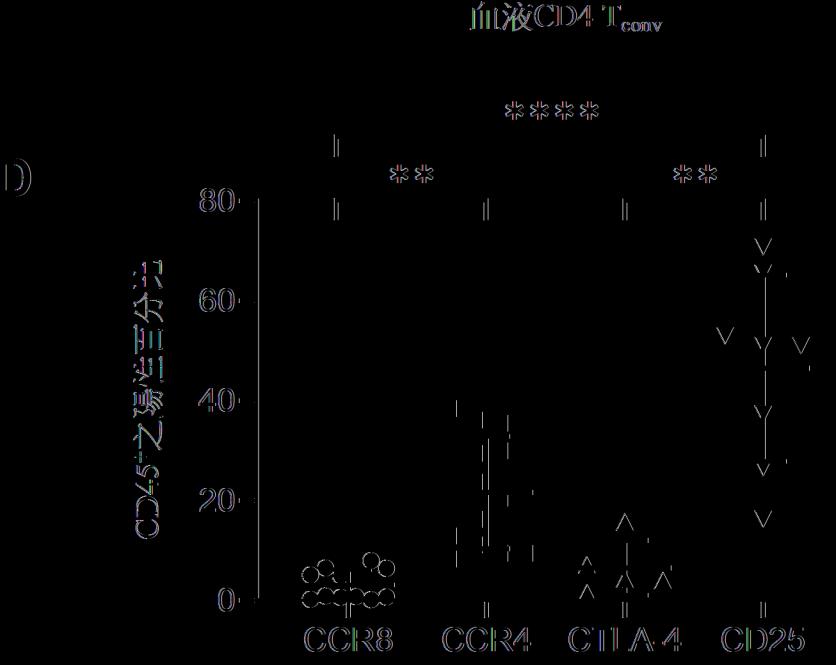

Treg上標MFI
B
10⁴
10³
10²
CCR8
CCR4
CTLA-4
CD25
腫瘤
血液

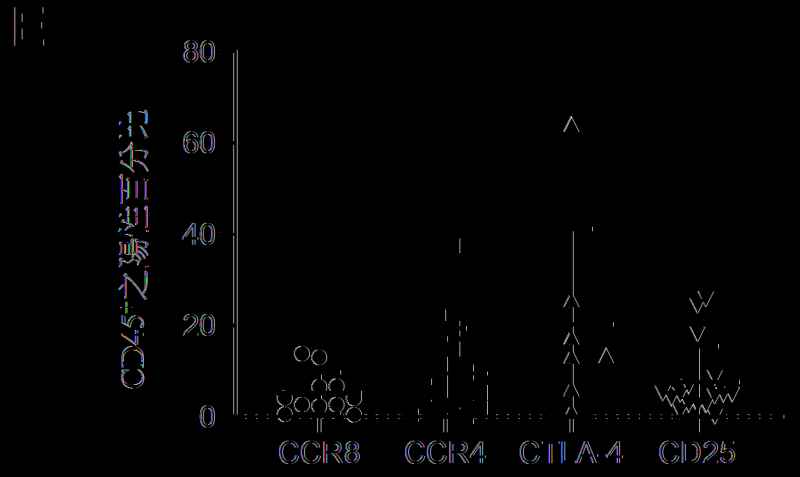
圖2A及2B


腫瘤CD4 T$_{conv}$
C
CD4 T$_{conv}$之表現百分比
80
60
40
20
0
CCR8
CCR4
CTLA4
CD25

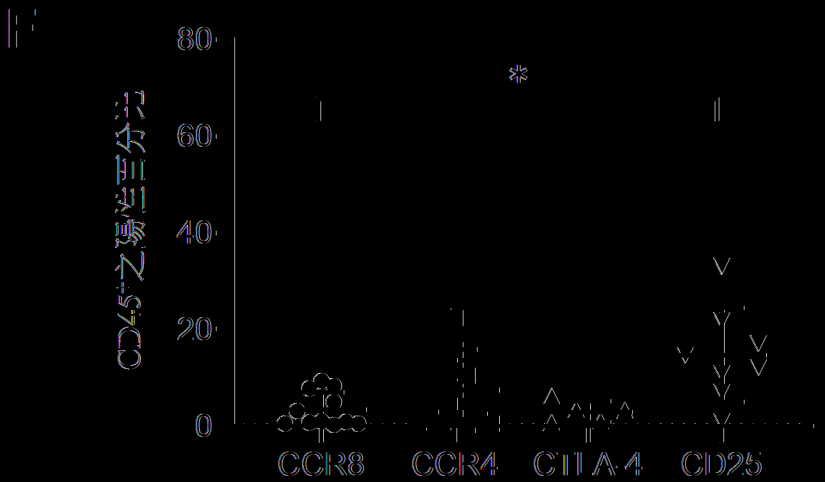

血液CD4 T$_{conv}$
D
CD45+之表現百分比
80
60
40
20
0
CCR8
CCR4
CTLA4
CD25

|(圖2C及2D)|

腫瘤CD8+T細胞



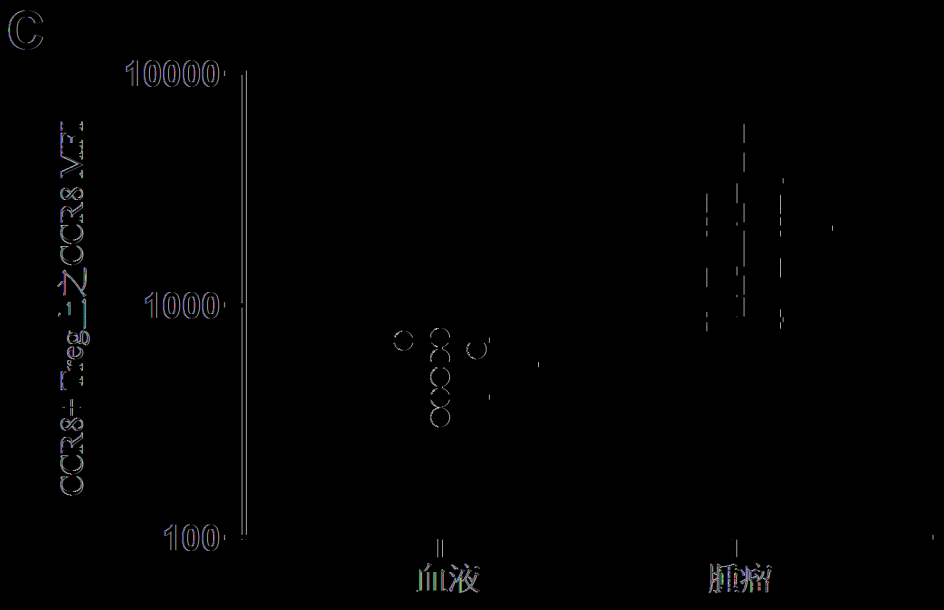
血液CD8+T細胞



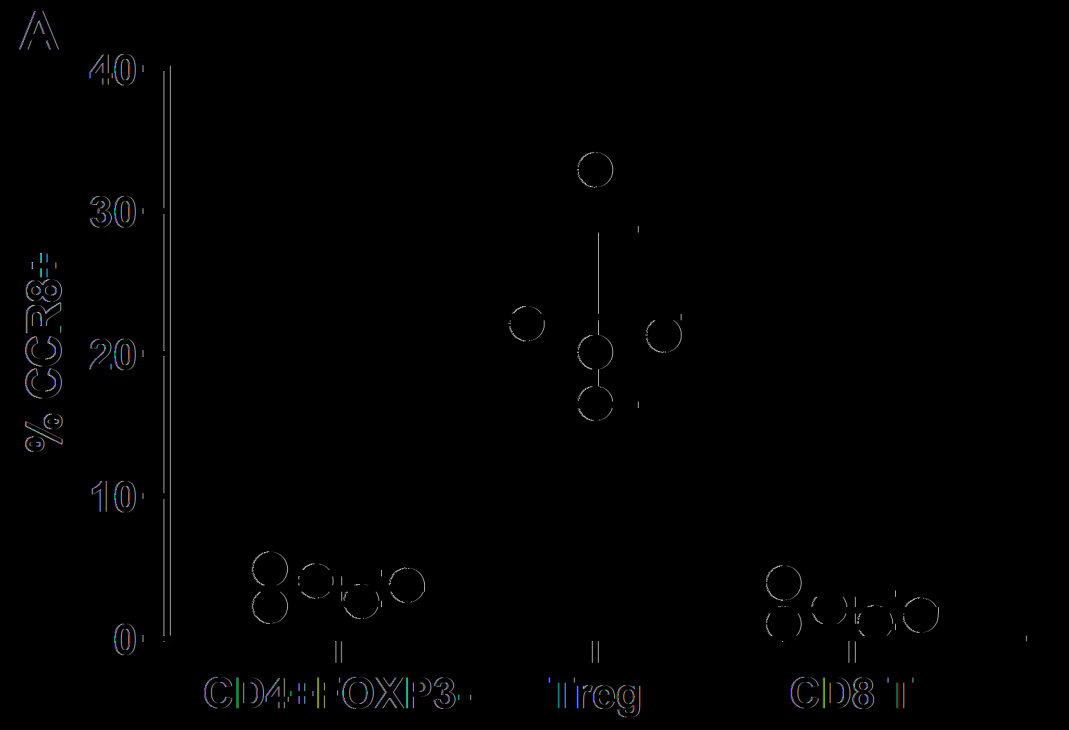
（圖2E及2F）

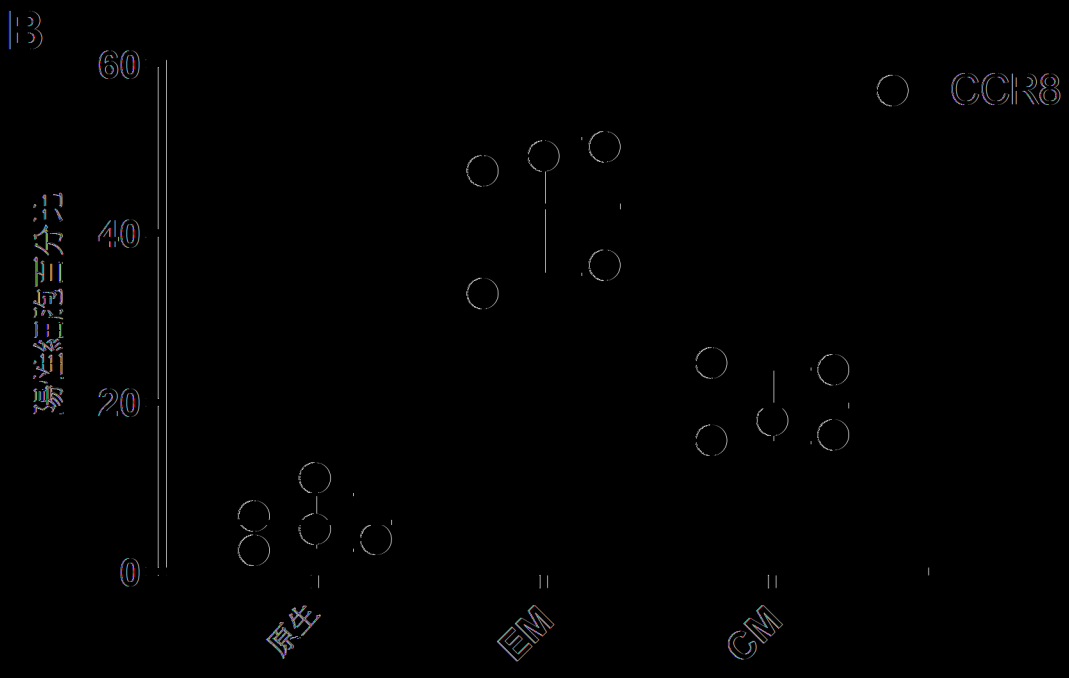
A
CCR8蛋白質表現
100
80
60
40
20
0
CD4 Tconv
Treg
CD8
B
CCR8 MFI
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
CD4 Tconv
Treg
CD8

（圖3A及3B）

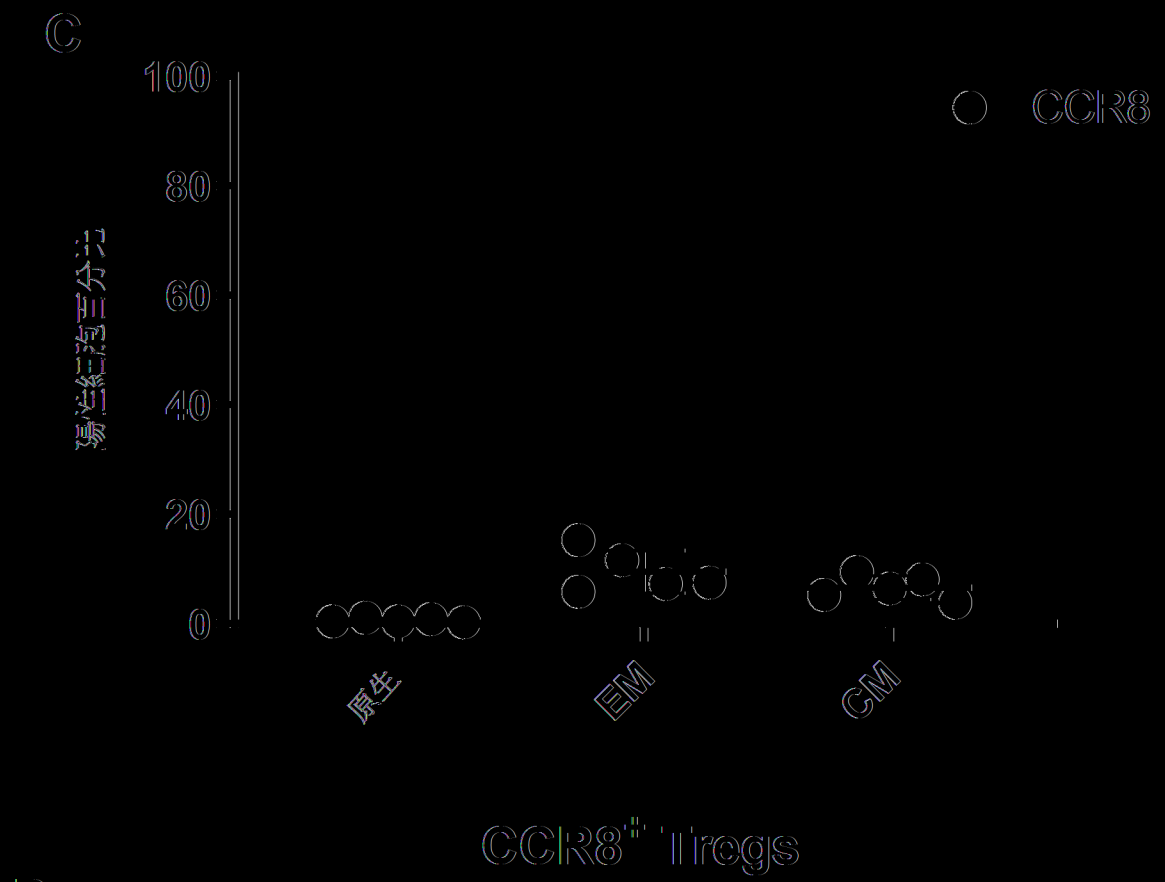


圖(圖3C)


A
% CCR8+
40
30
20
10
0
CD4+FOXP3+ Treg
CD8+T

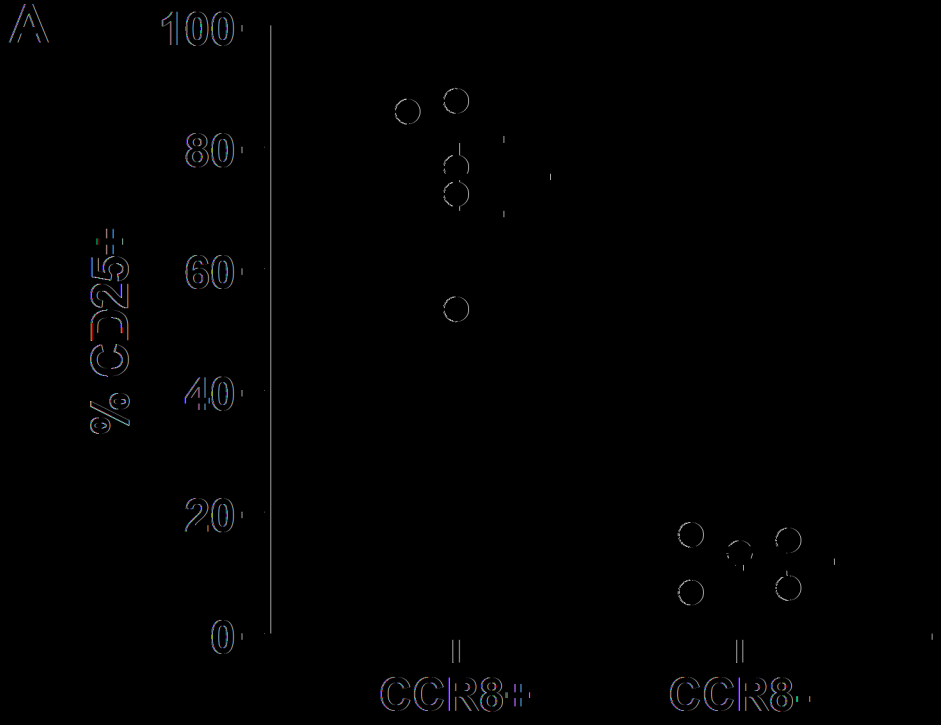

B
腫瘤浸潤淋巴細胞
60
40
20
0
CCR8
原生
EM
CM

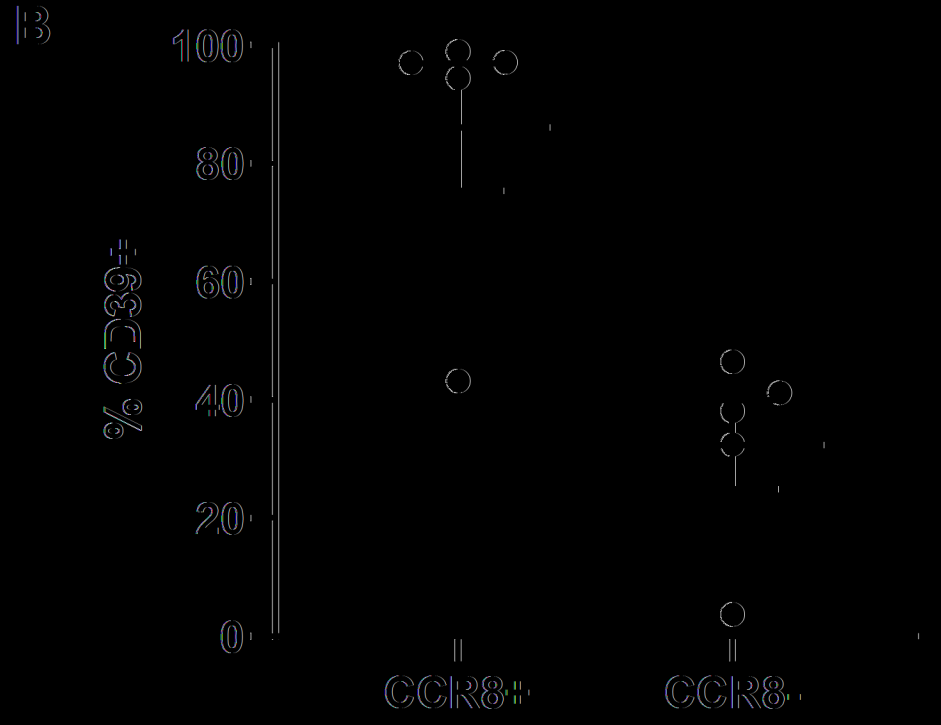
（圖4A及4B）



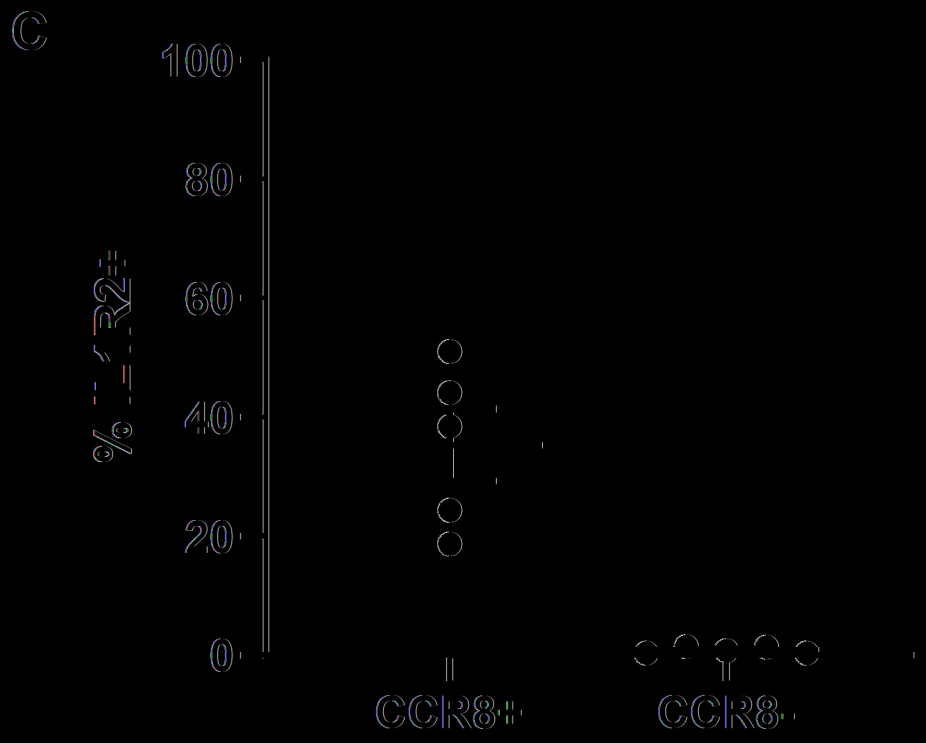
|(圖4C及4D)|

CCR8
CCR8
CCR8


A
100
80
60
40
20
0
% CD25+
CCR8+
CCR8-


B
100
80
60
40
20
0
% CD39+
CCR8+
CCR8-

圖(圖6A及6B)


C
100
80
60
40
20
0
% of CD8+
CCR8+
CCR8-

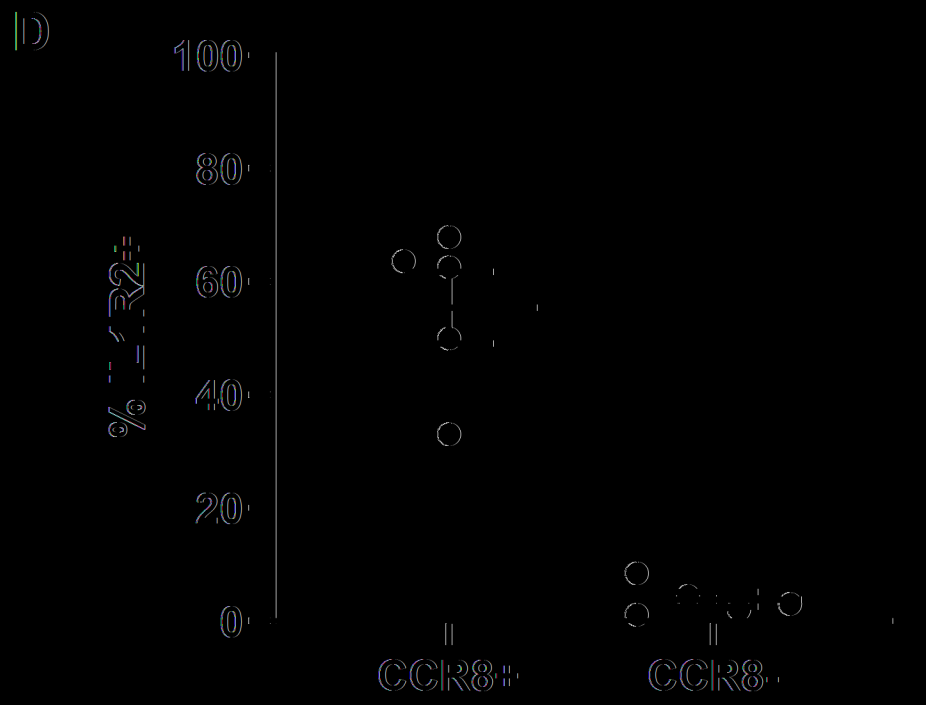
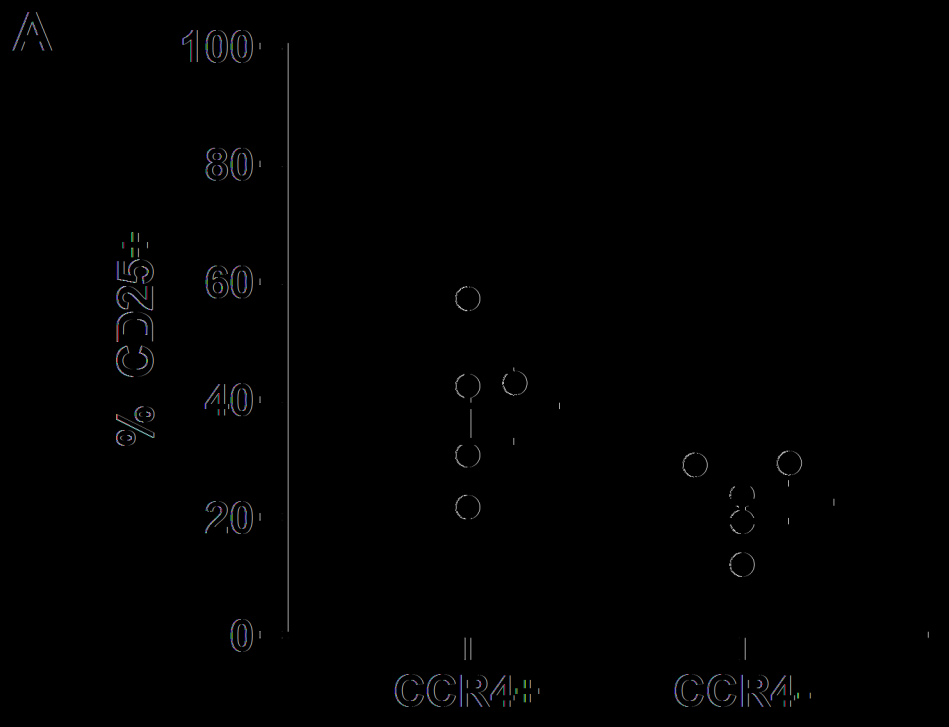
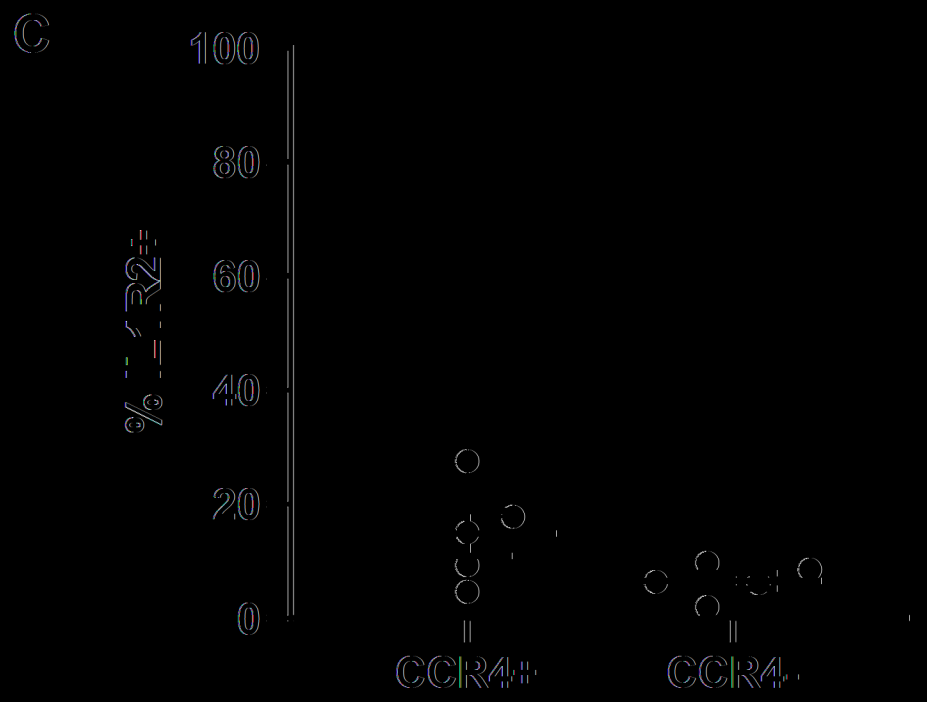

D
100
80
60
40
20
0
% of CD8+
CCR8+
CCR8-

圖6C及6D


A
100
80
60
40
20
0
% CD25+
CCR4+
CCR4-


B
100
80
60
40
20
0
% CD38+
CCR4+
CCR4-

圖7A及7B



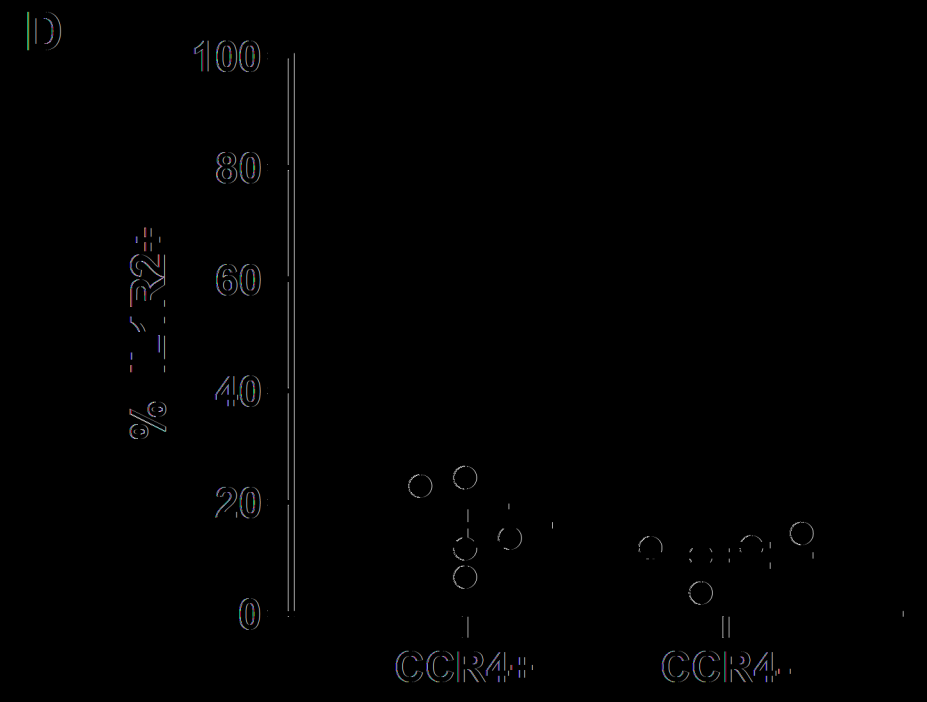
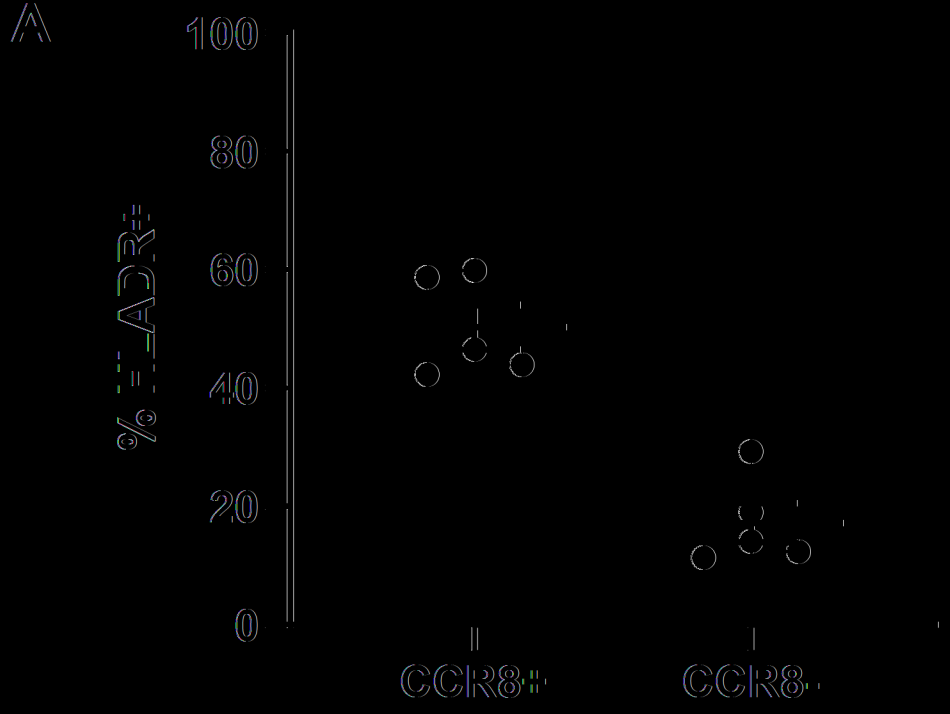


圖7C及7D


A
100
80
60
40
20
0
% of ADR+
CCR8+
CCR8-

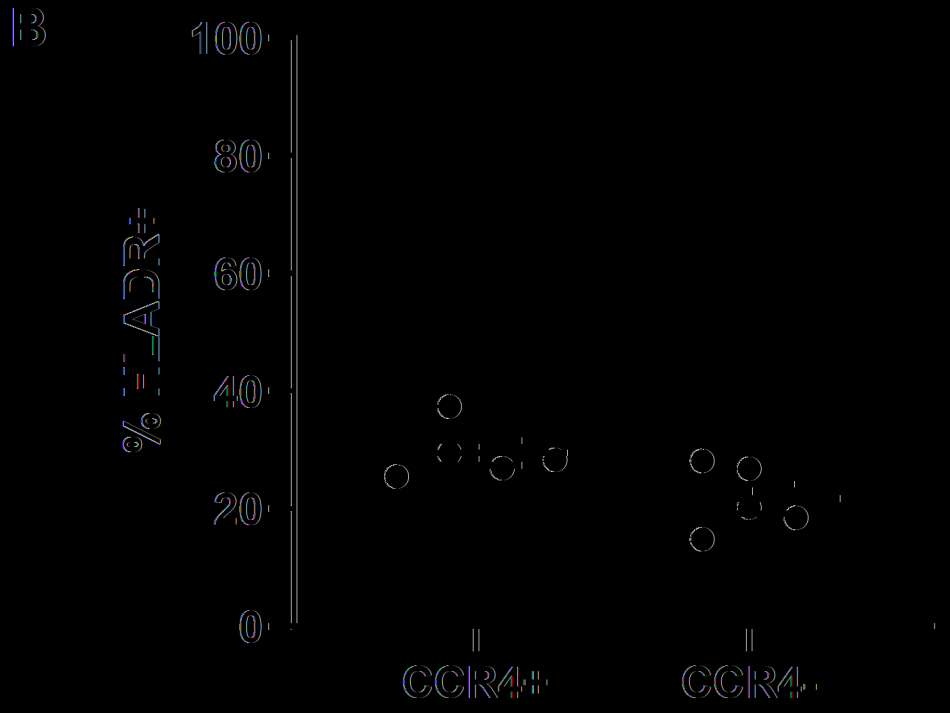
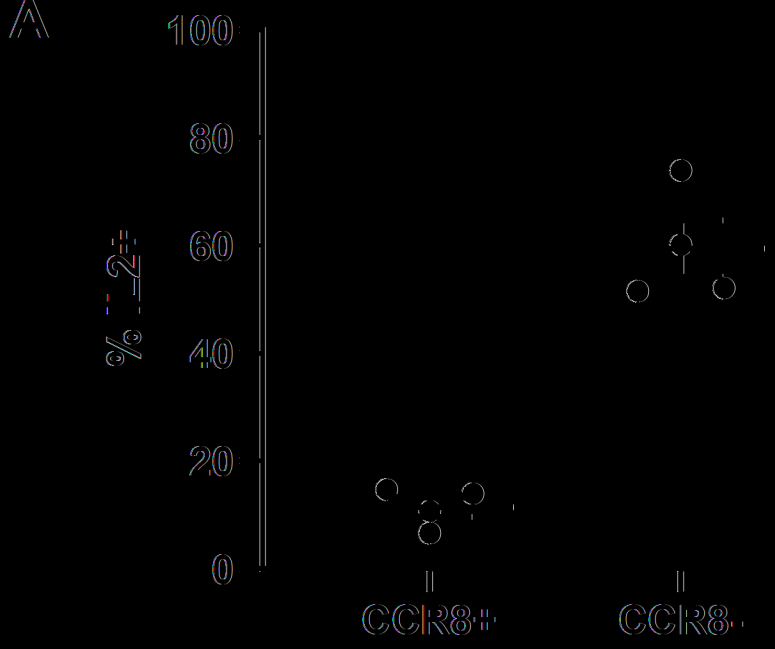

B
100
80
60
40
20
0
% of ADR+
CCR4+
CCR4-

圖8A及8B



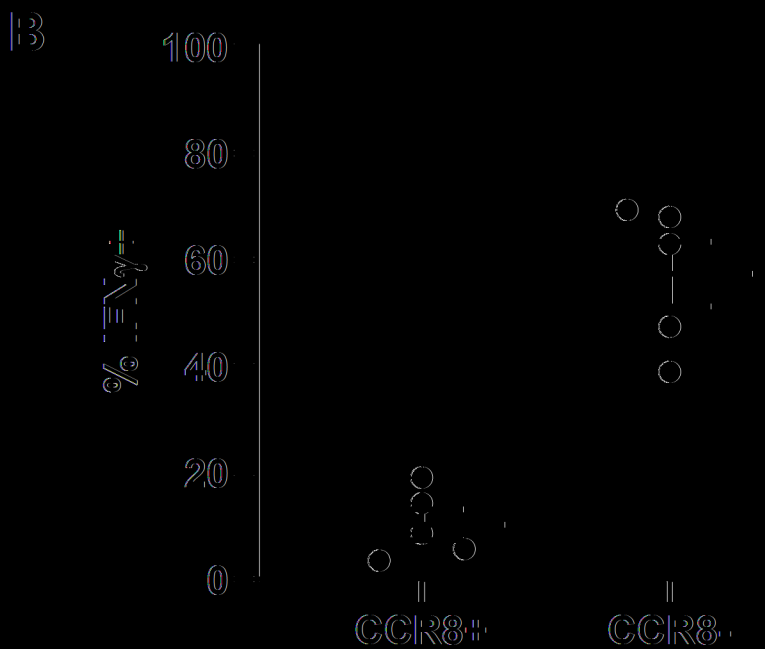
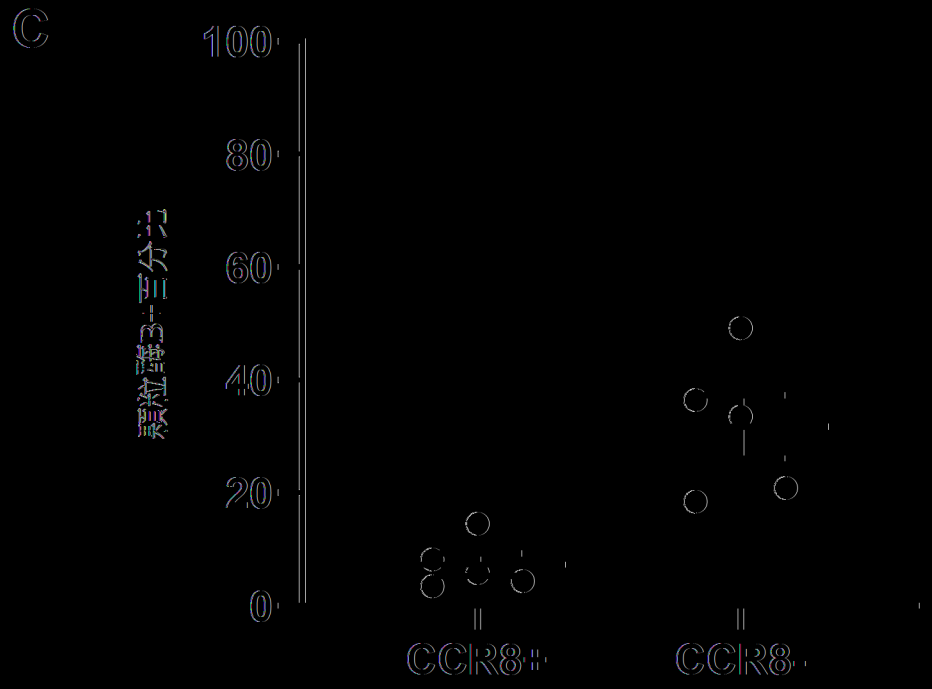
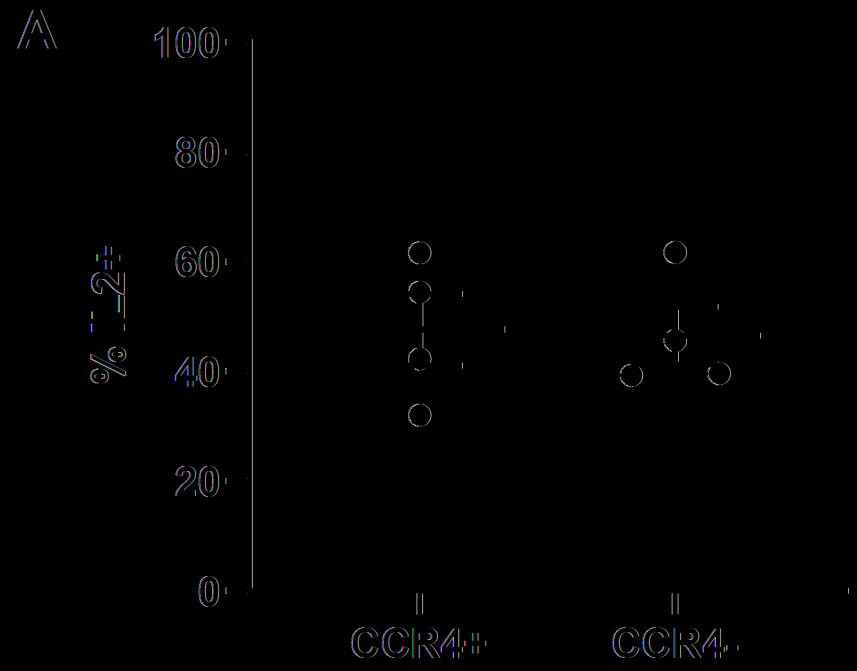


圖9A及9B



(圖9C)



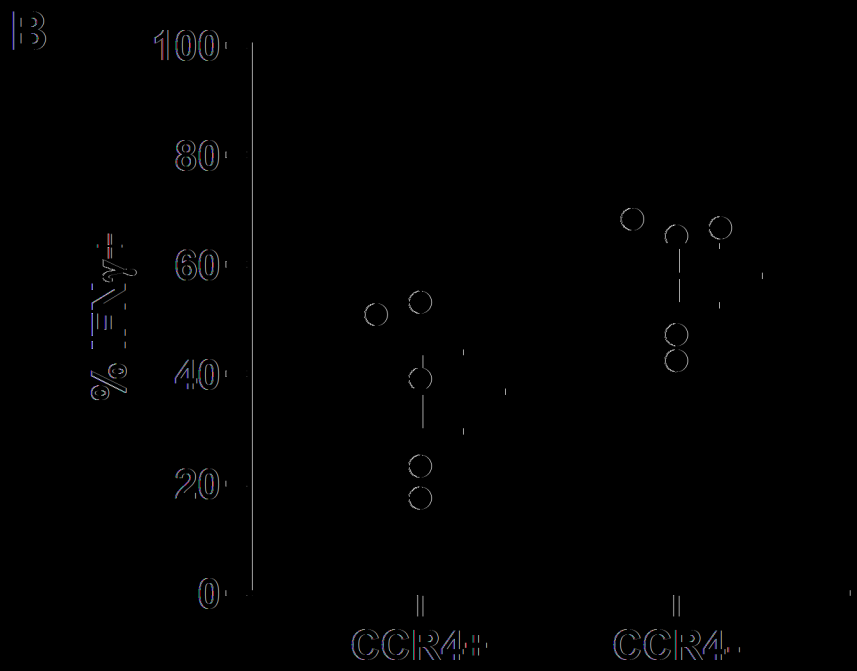
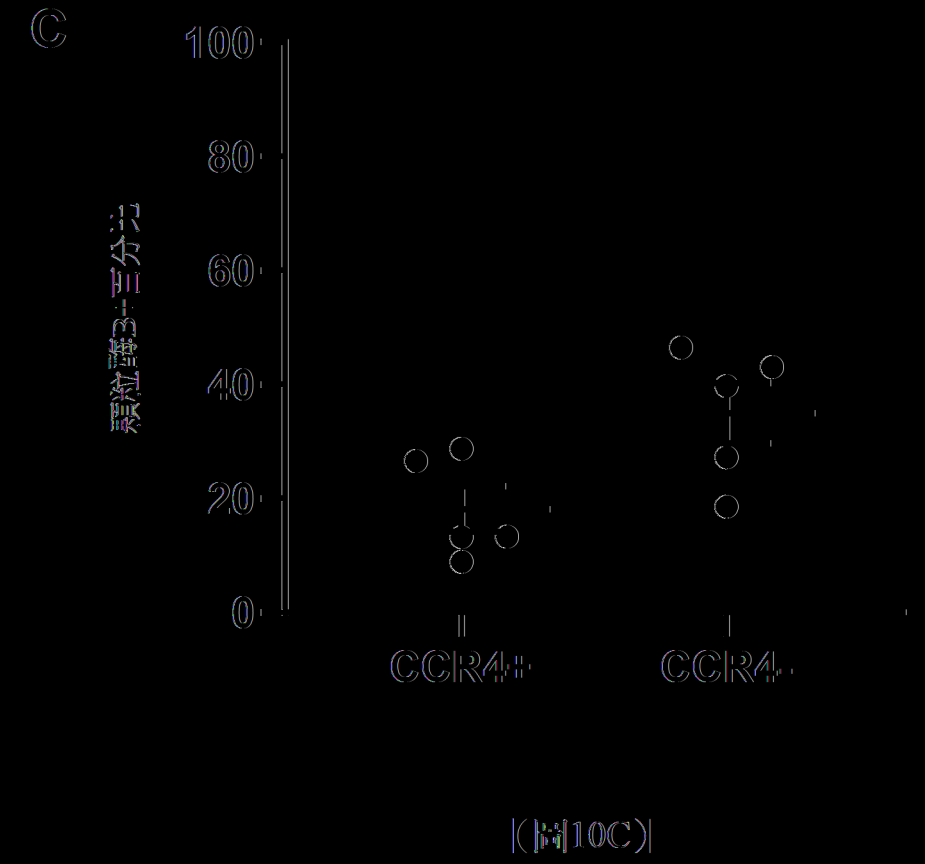


圖10A及10B



(B細胞)

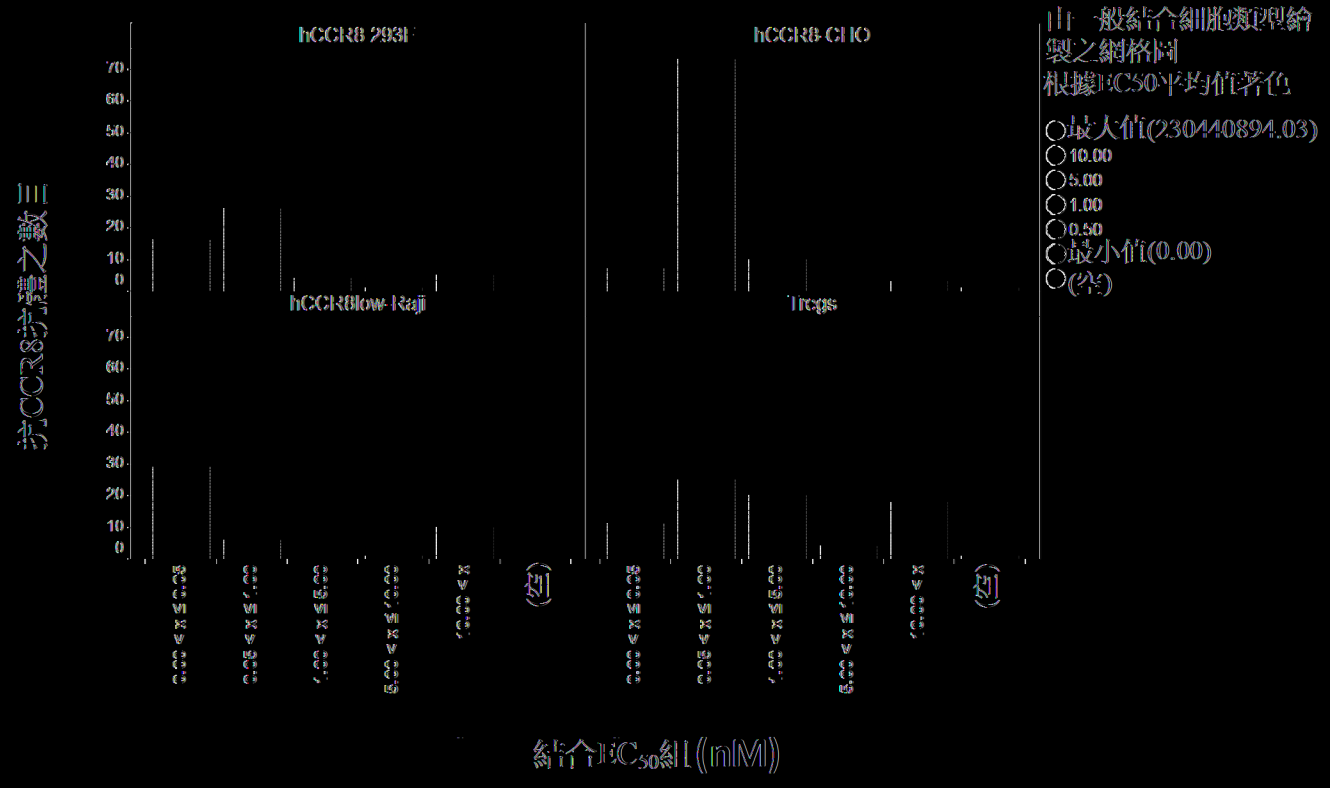
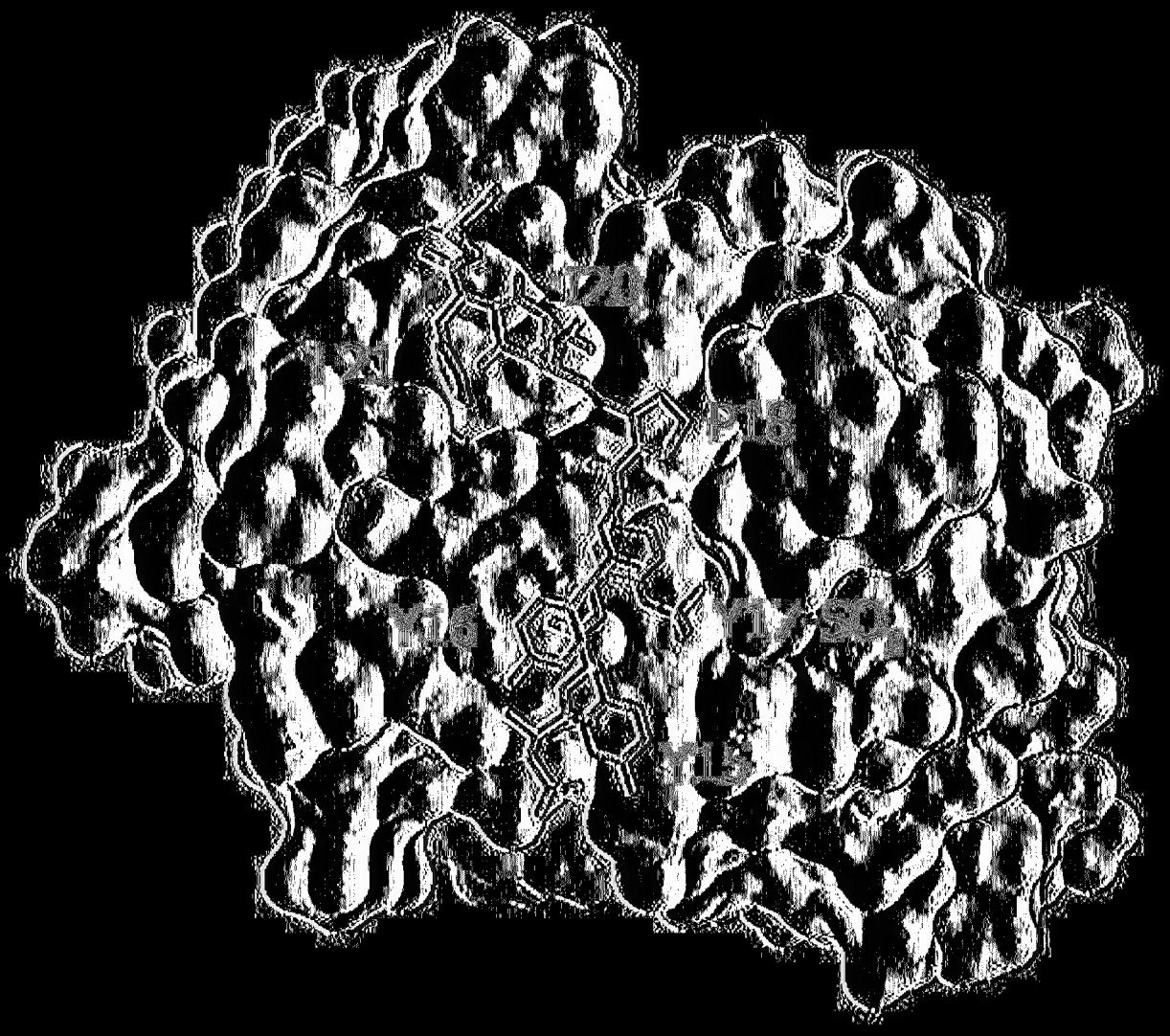
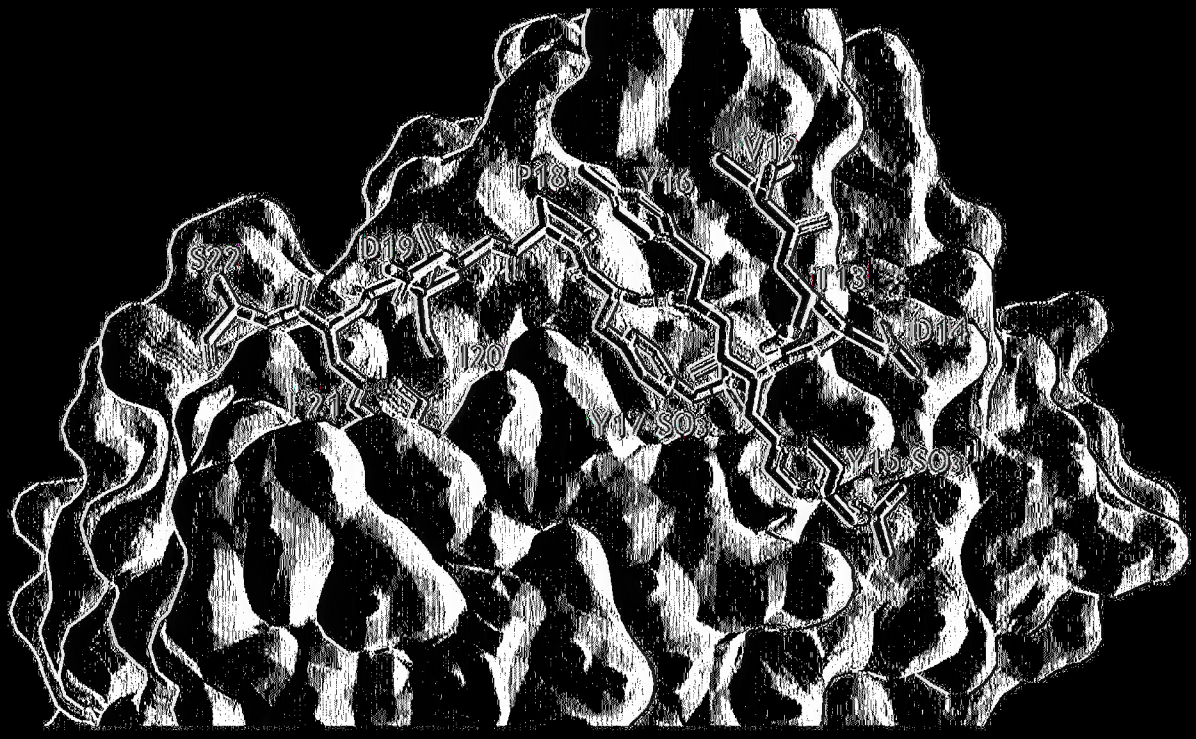

hCCR8 293F
hCCR8 CHO
hCCR8low Raji
Tregs
70
60
50
40
30
20
10
0
結合IC50組(nM)
由一般結合細胞類型給製之網格圖
根據IC50平均值著色
○最大值(230440894.03)
○10.00
○5.00
○1.00
○0.50
○最小值(0.00)
○(空)

圖11A

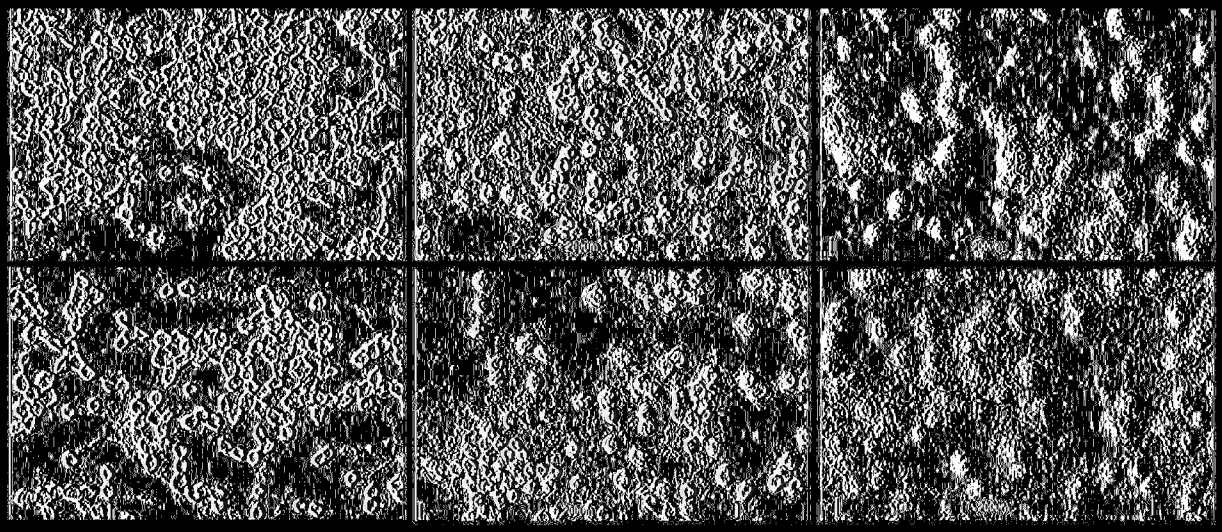

1.60E+001
1.40E+001
1.20E+001
1.00E+001
8.00E+000
6.00E+000
4.00E+000
2.00E+000
0.00E+000
E(S) (V)
8.55
10.83
15.47
16.36
4A.9
18.12
|(|H11B)|

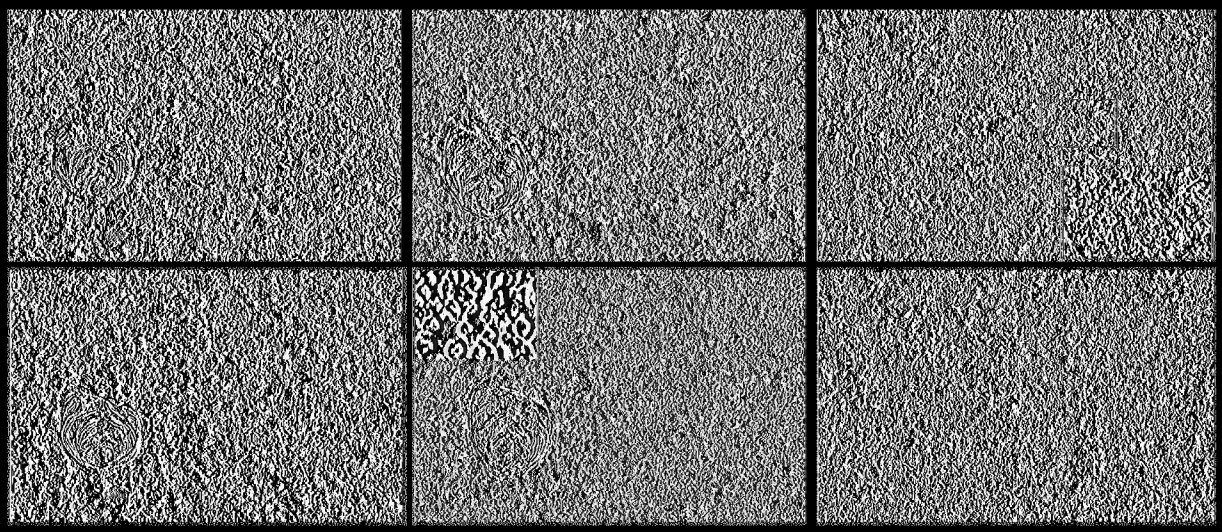


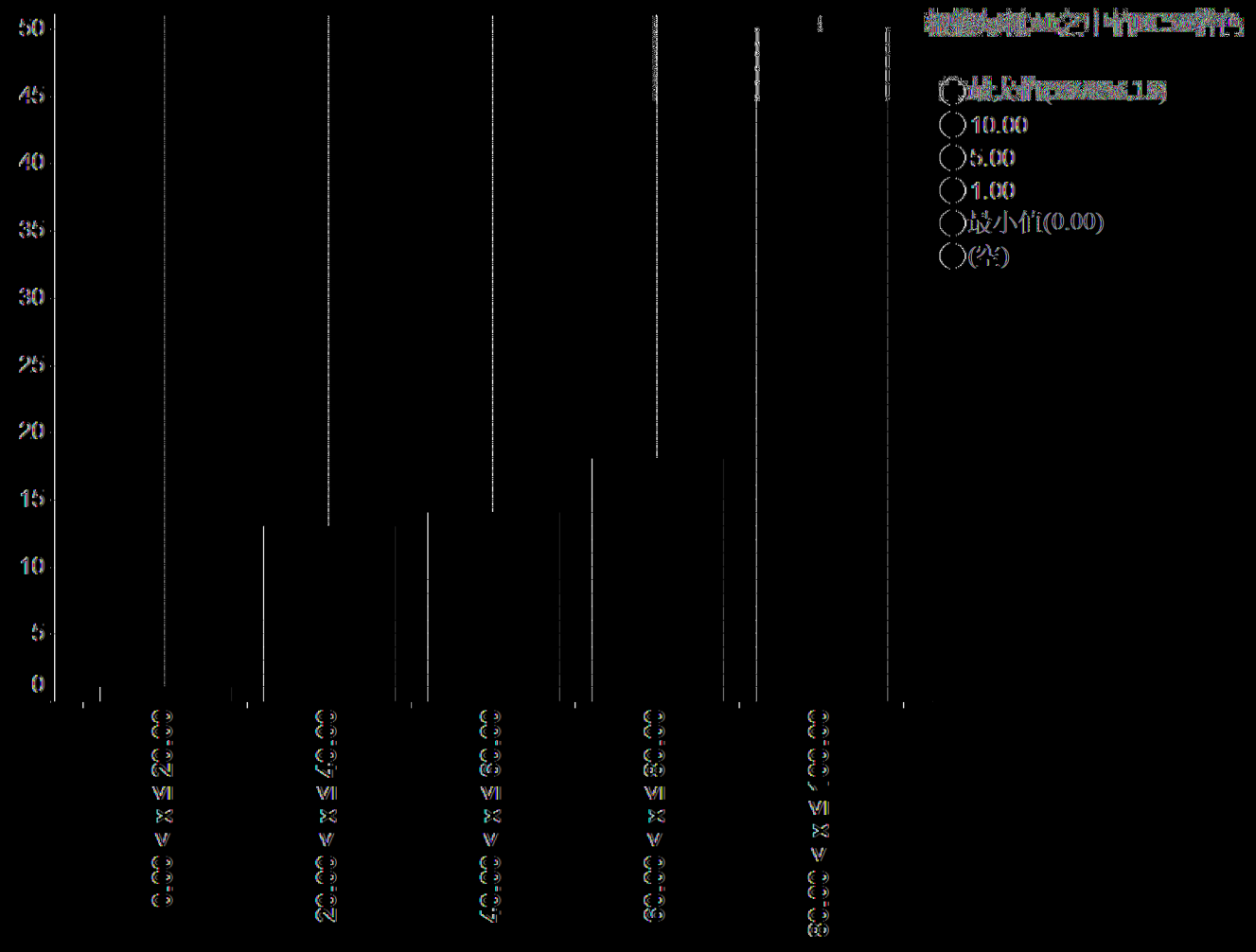
|(圖12A)|



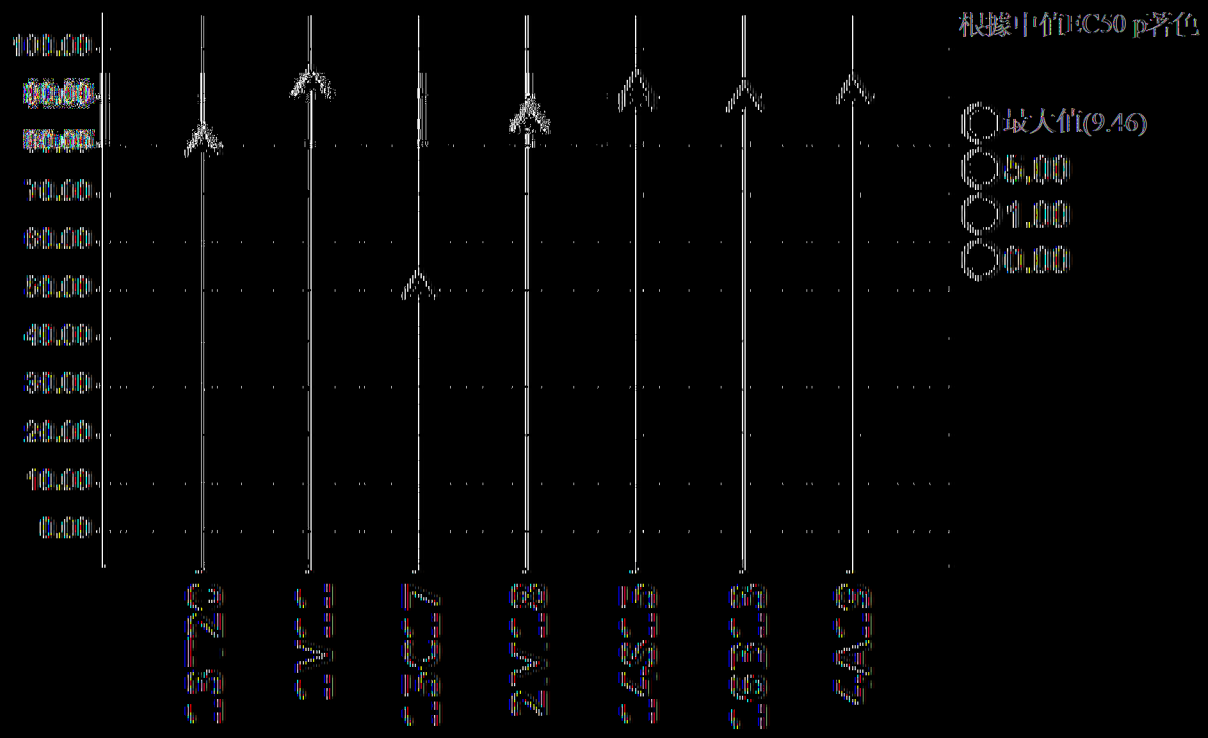
[圖1.2.3]







|(圖14A)|


100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
根據中值C50 p落色
最大值(9.46)
5.00
1.00
0.00

|(詞143)|

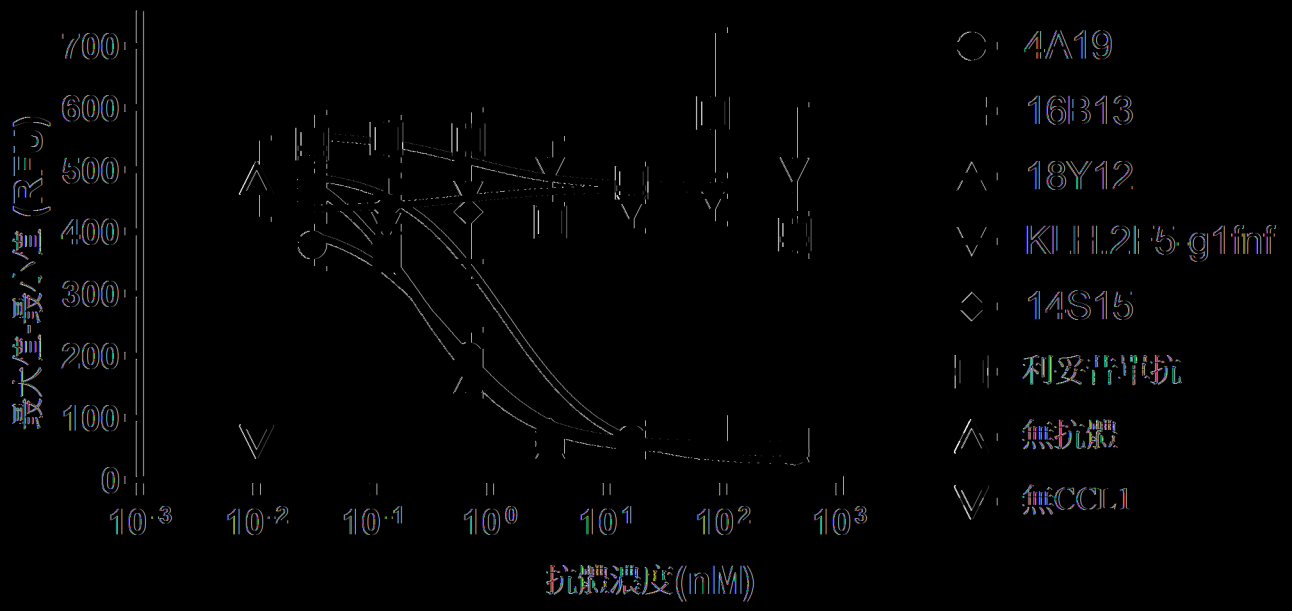
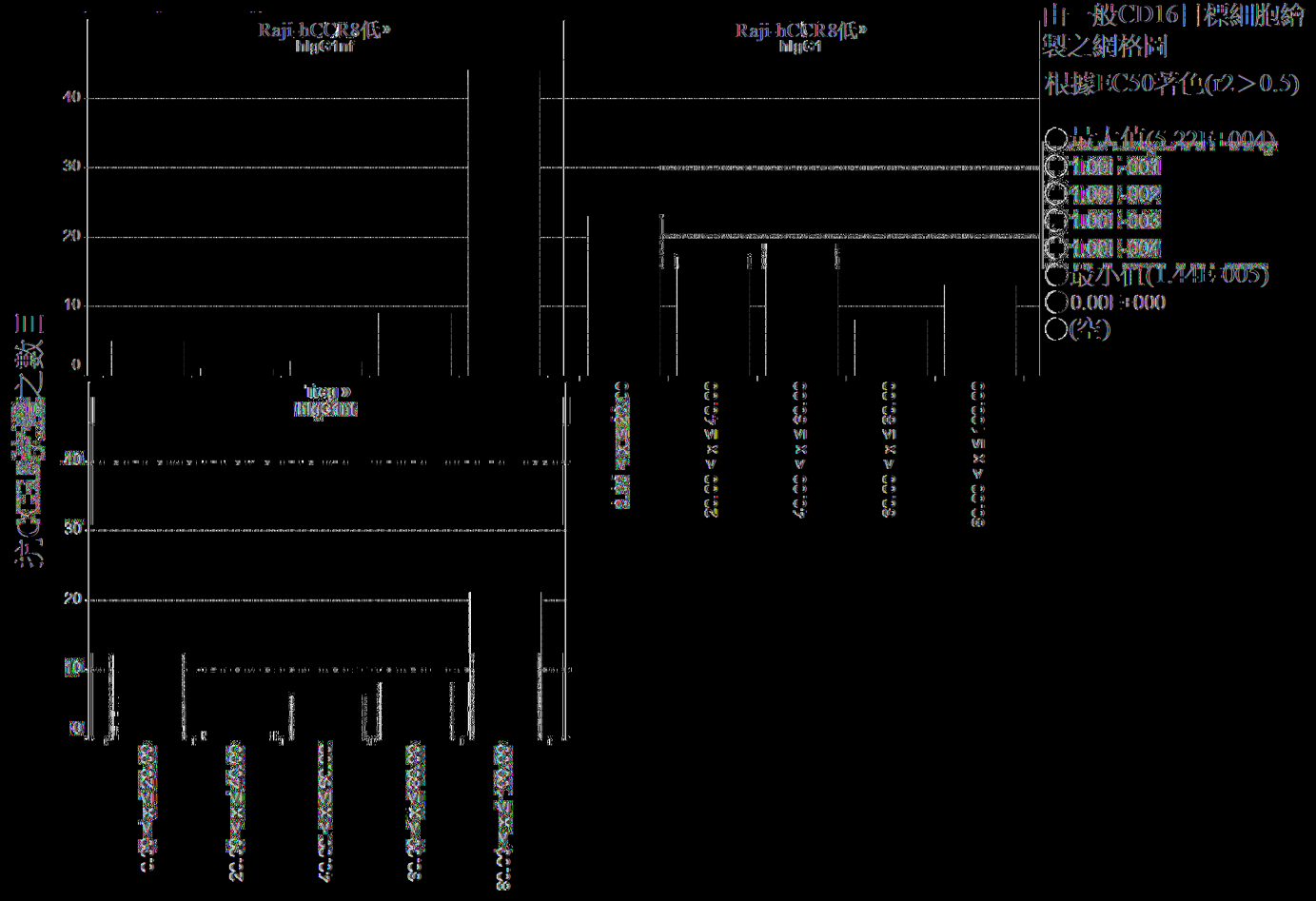
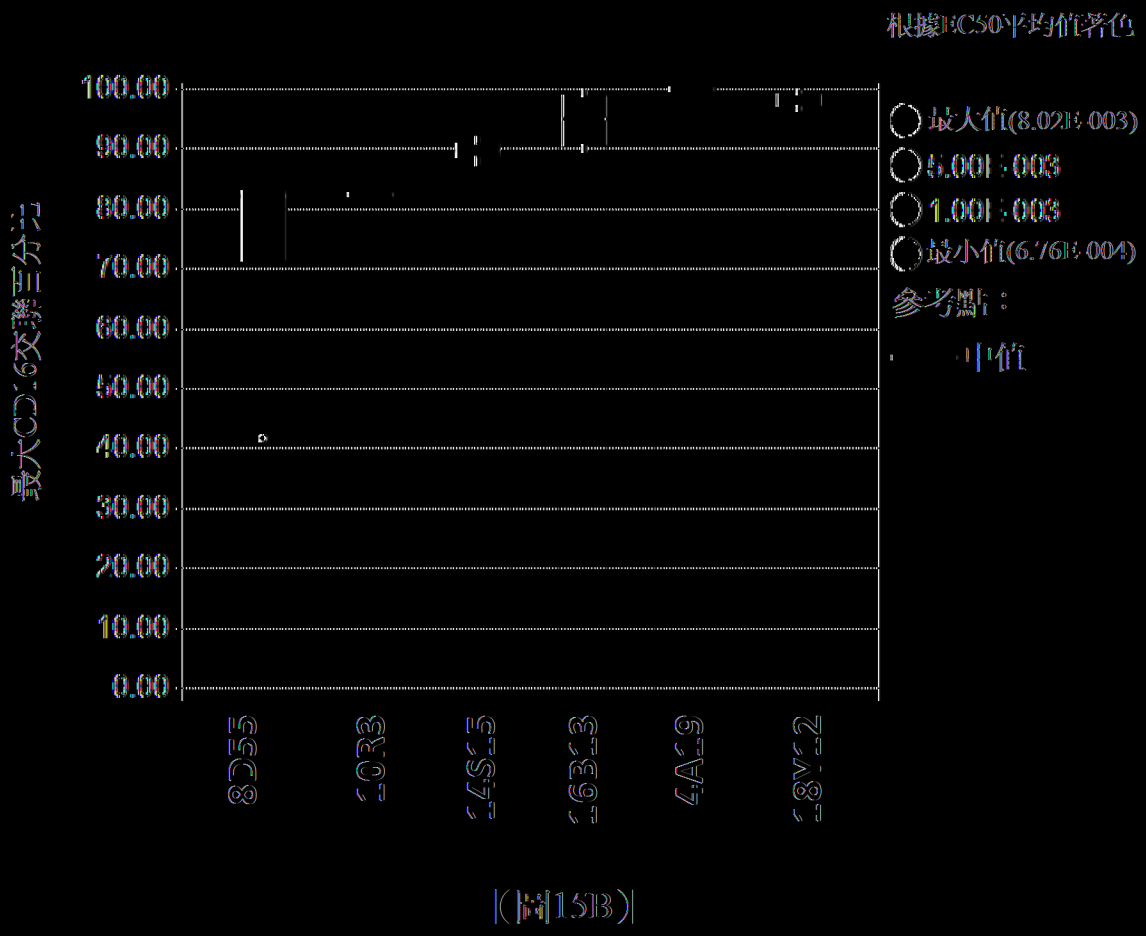
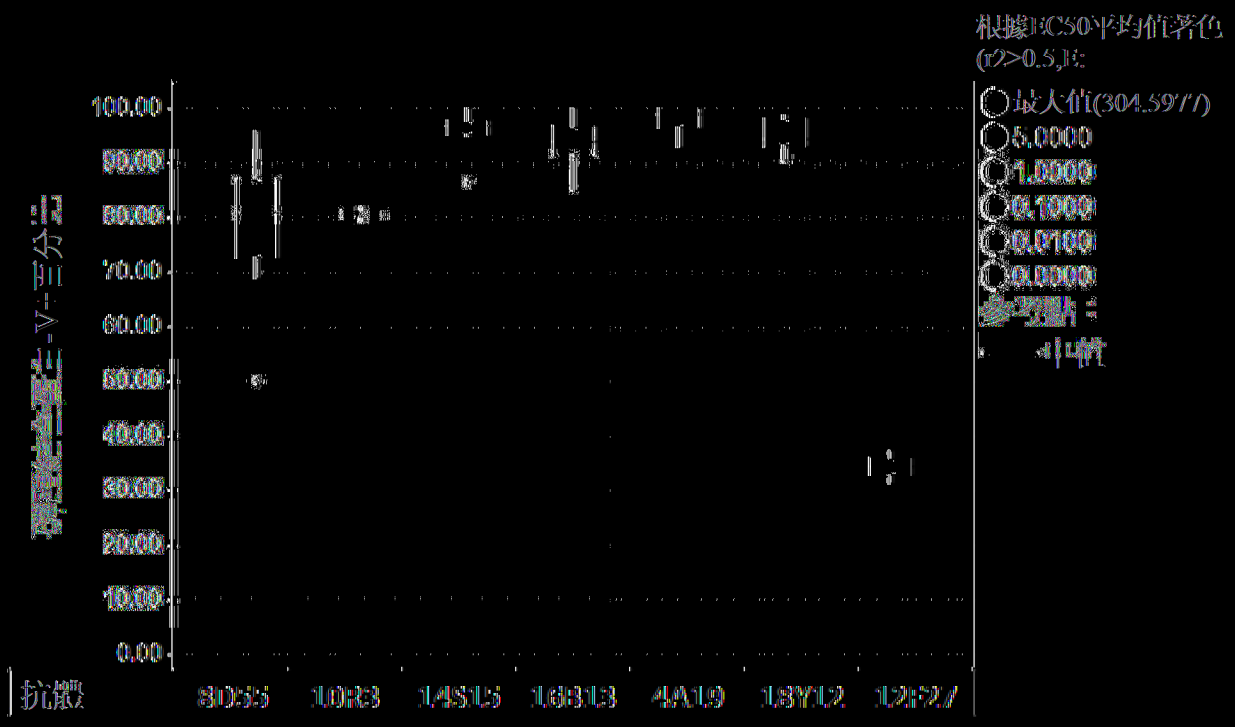

螢光強度(RFU)
700
600
500
400
300
200
100
0
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
抗體濃度(nM)
4A19
16B13
18Y12
KLH-L2F5.g1fnf
14S15
利妥昔單抗
無抗體
無CCL1

圖14C

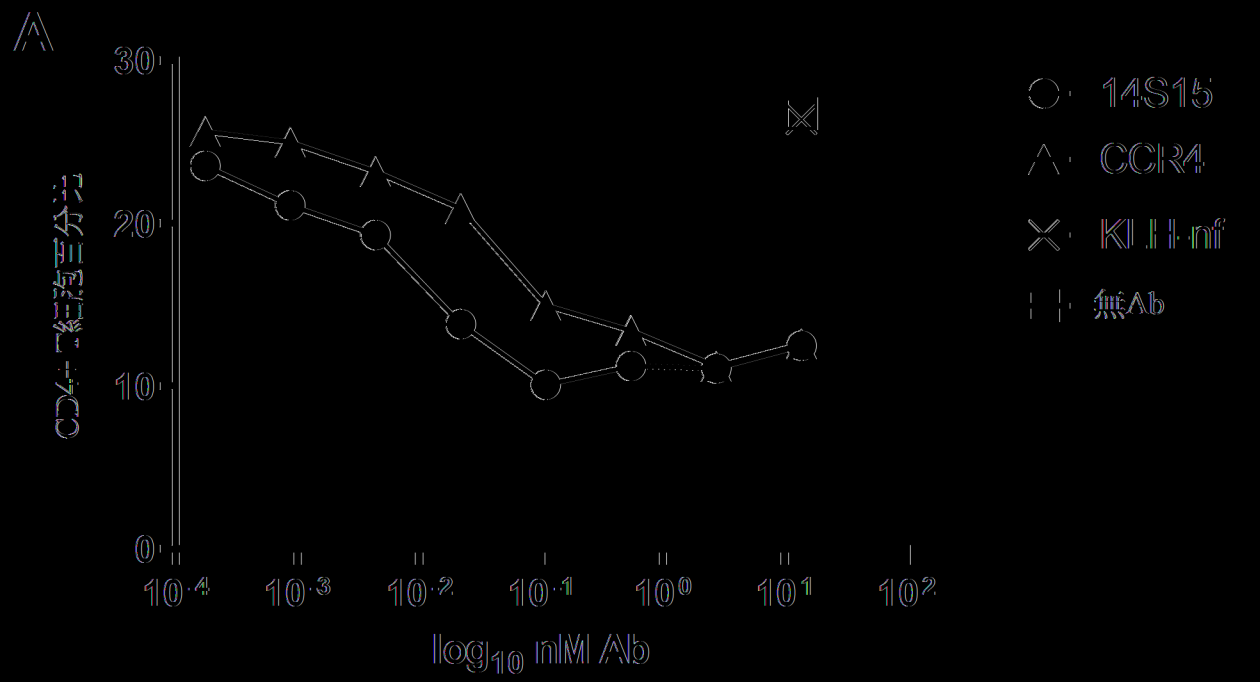

Raji-hCCR8低»
hIgG4inf
Raji-hCCR8低»
hIgG4
由一般CD16白標細胞納
製之網格圖
根據EC50著色(r2＞0.5)
最小值(6.221E+004)
1.00E+005
1.00E+006
1.00E+007
1.00E+008
最小值(1.74E+005)
0.00E+000
(空)
細胞毒殺活性(%)
40
30
20
10
0
hCCR8
hIgG4inf
hCCR8
hIgG4
0.08 nM
20.00 nM
40.00 nM
60.00 nM
80.00 nM
0.08 nM
20.00 nM
40.00 nM
60.00 nM
80.00 nM

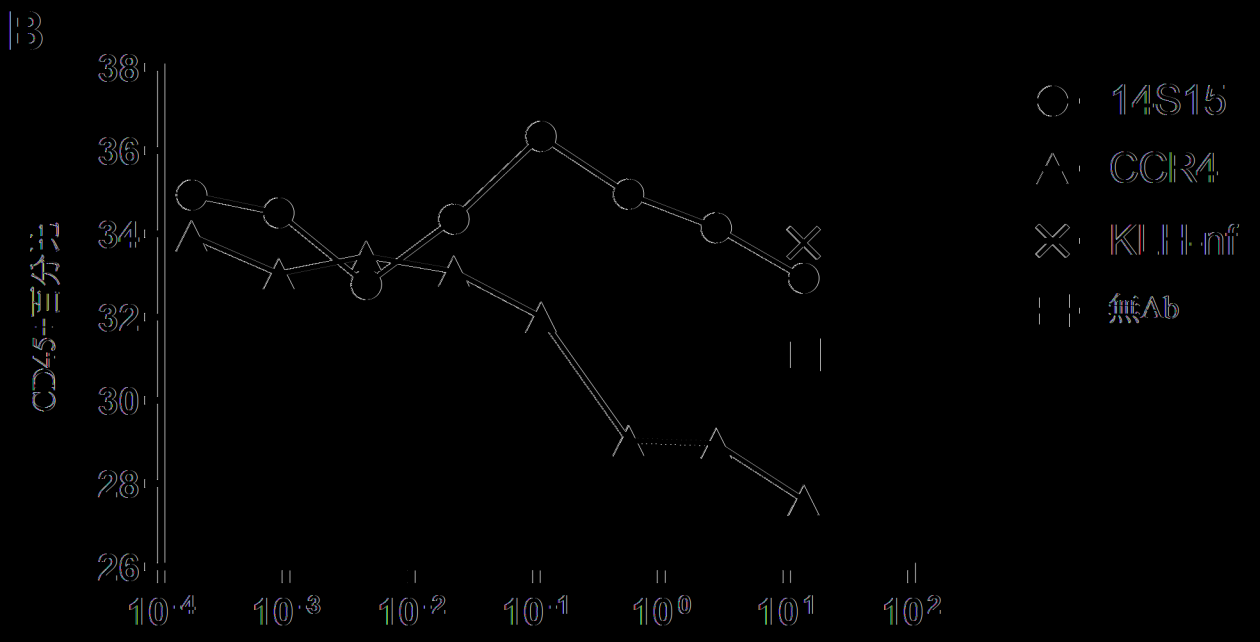
圖(圖15A)


根據FC50平均作答色
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
最大CO,6次測量分布
最大值(8.02E-003)
5.001E-003
1.001E-003
最小值(6.76E-004)
參考點：
中值
8C5
,983
,7S1
,6E3
4A9
,8V2
|(岡15B)|

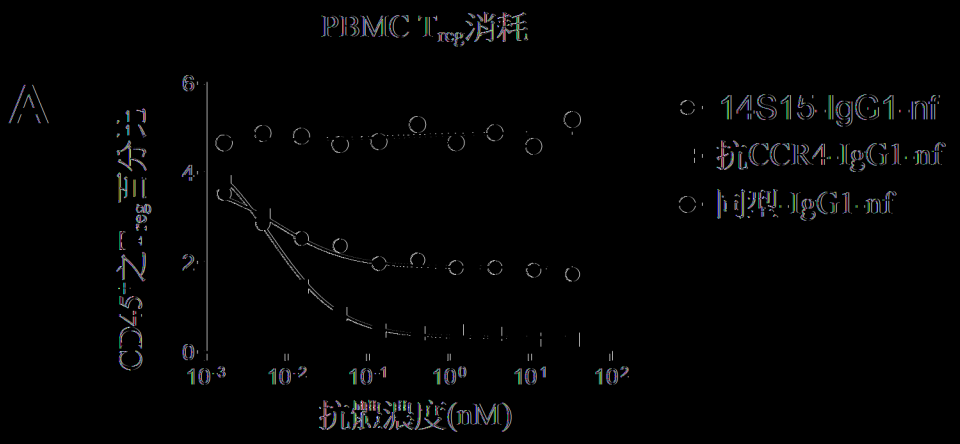

根據IC50平均值著色
(r2>0.5,E:
最大值(304.5977)
5.0000
1.0000
0.1000
0.0100
0.0000
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
8D5B5
10R83
14S1L5
1G813
4A19
1BYL2
12F27

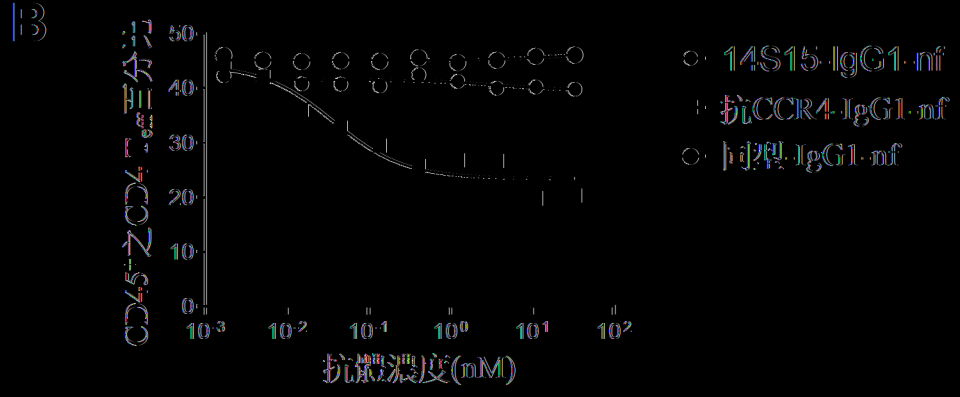
|(圖16)|

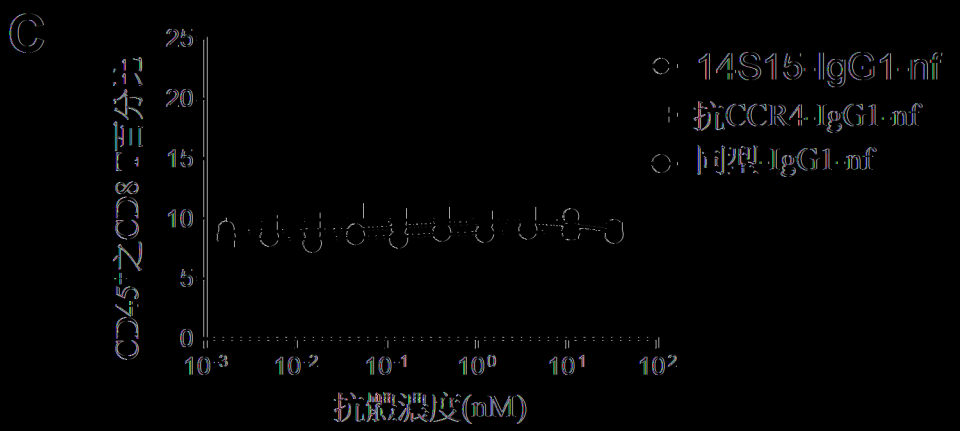

A
CD4+ T細胞分率
30
20
10
0
10-4
10-3
10-2
10-1
100
101
102
log10 nM Ab
14S15
CCR4
KH-nf
無Ab


B
CD45+ T細胞分率
38
36
34
32
30
28
26
10-4
10-3
10-2
10-1
100
101
102
log10 nM Ab
14S15
CCR4
KH-nf
無Ab

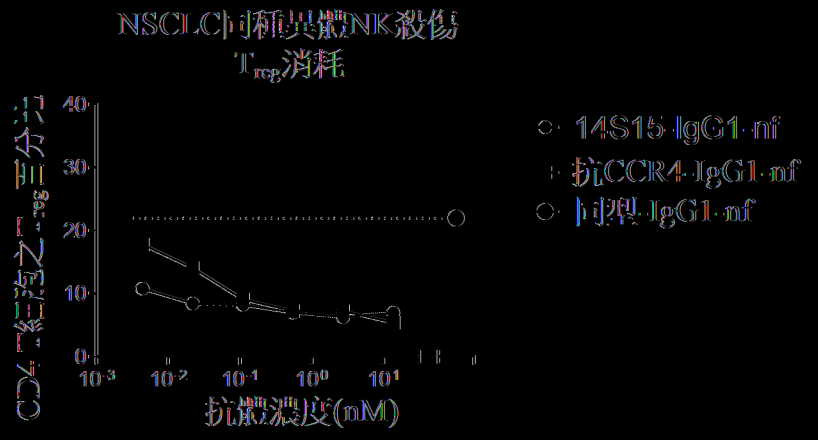
(圖17A及17B)

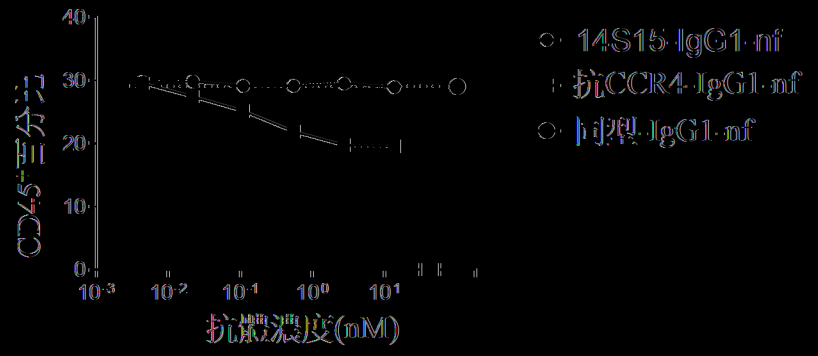

PBMC T_{reg}消耗
A
CD45+之T_{reg}百分比
6
4
2
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
抗體濃度(nM)
14S15-IgG1-nf
抗CCR4-IgG1-nf
同型-IgG1-nf

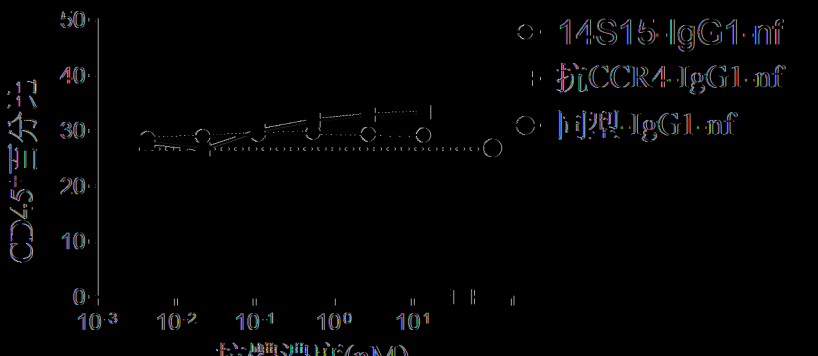

PBMC CD4 T_{conv}消耗
B
CD45+之CD4 T_{conv}百分比
50
40
30
20
10
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
抗體濃度(nM)
14S15-IgG1-nf
抗CCR4-IgG1-nf
同型-IgG1-nf


PBMC CD8 T細胞消耗
C
CD45+之CD8 T細胞百分比
25
20
15
10
5
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
抗體濃度(nM)
14S15-IgG1-nf
抗CCR4-IgG1-nf
同型-IgG1-nf

|(圖18A-18C)|


NSCLC同種異體NK殺傷
Treg消耗
CD4+ Treg之CD45+百分比
抗體濃度(nM)
14S15-IgG1-nf
抗CCR4-IgG1-nf
同型-IgG1-nf


NSCLC同種異體NK殺傷
CD4+ Tconv消耗
CD45+百分比
抗體濃度(nM)
14S15-IgG1-nf
抗CCR4-IgG1-nf
同型-IgG1-nf


NSCLC同種異體NK殺傷
CD8+細胞消耗
CD45+百分比
抗體濃度(nM)
14S15-IgG1-nf
抗CCR4-IgG1-nf
同型-IgG1-nf

(圖18D-18F)

G

NSCLC

T_{reg}消耗

CD4+細胞之Treg分泌 [%]

60
50
40
30
20
10
0

****
****
^^^

○ 同型IgG1-nf
^ 16B13-IgG1-nf
16B13-IgG1-脂性

H

腎細胞癌

T_{reg}消耗

CD4+細胞之Treg分泌 [%]

40
30
20
10
0

*
^^^

○ 同型IgG1-nf
^ 16B13-IgG1-nf

I

胃癌

T_{reg}消耗

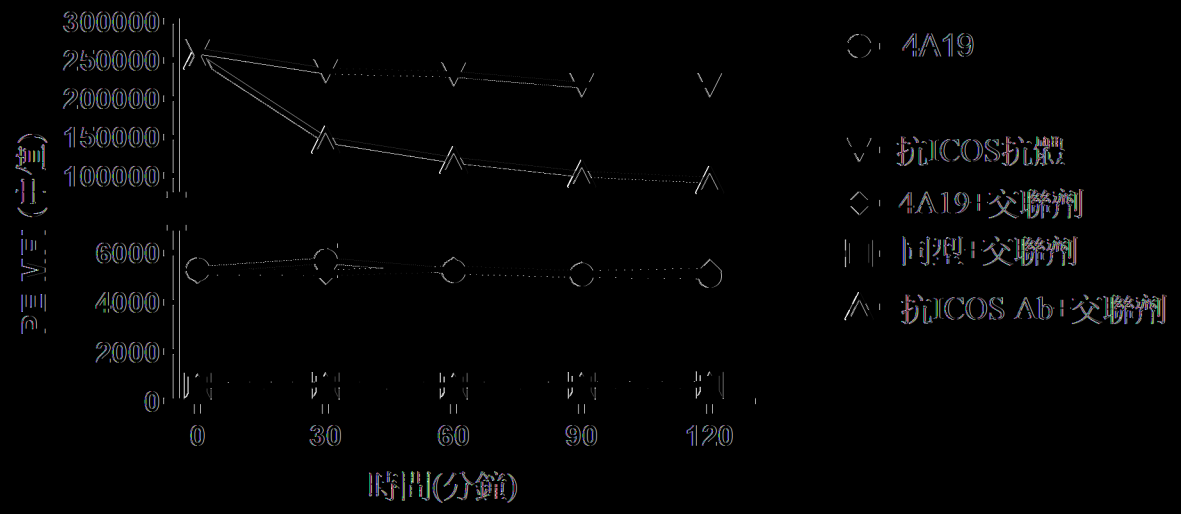
CD4+細胞之Treg分泌 [%]

60
50
40
30
20
10
0

*
○○○
^^^
^

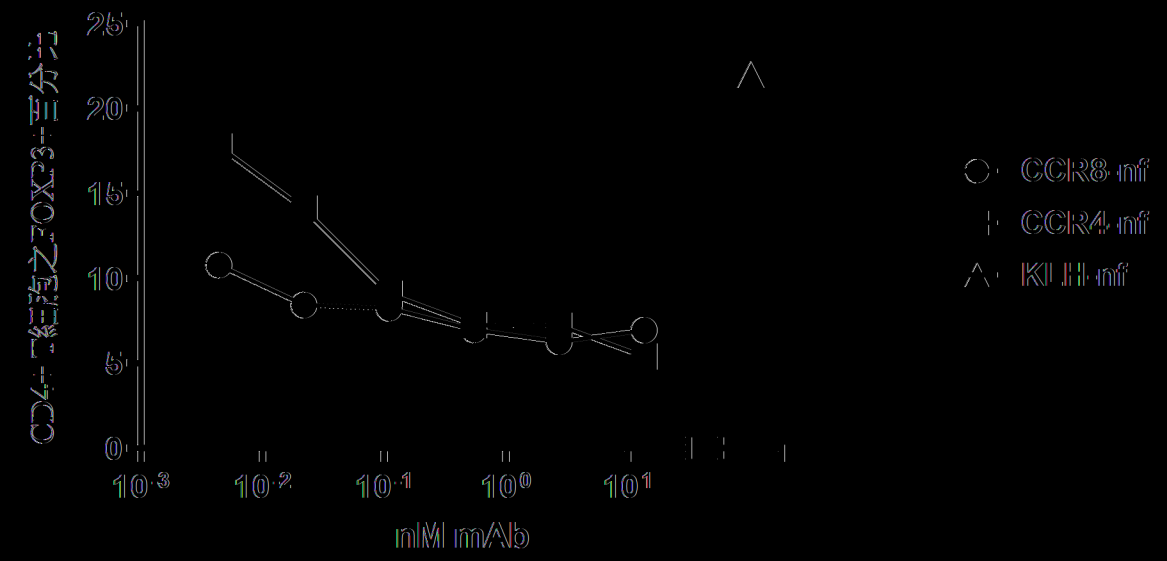
○ 同型IgG1-nf
^ 16B13-IgG1-nf

(圖18G-18I)

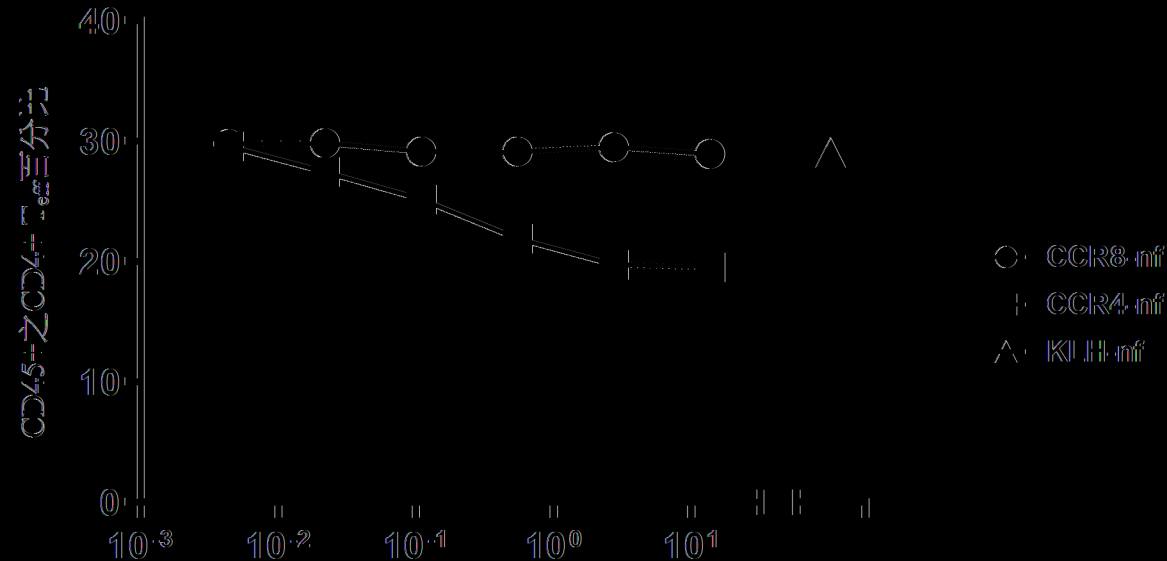

300000
250000
200000
150000
100000
6000
4000
2000
0
0
30
60
90
120
時間(分鐘)
4A19
抗ICOS抗體
4A19+交聯劑
同型+交聯劑
抗ICOS Ab+交聯劑

|(圖19)|

A

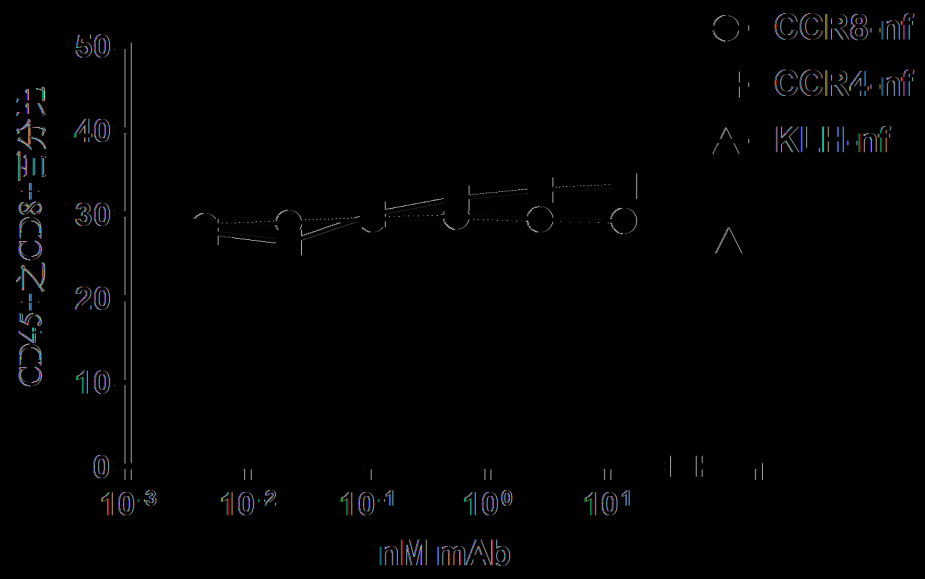

CD4+ T細胞之FOXP3+百分比
25
20
15
10
5
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
nM mAb
CCR8 mf
CCR4 mf
KHH mf

B

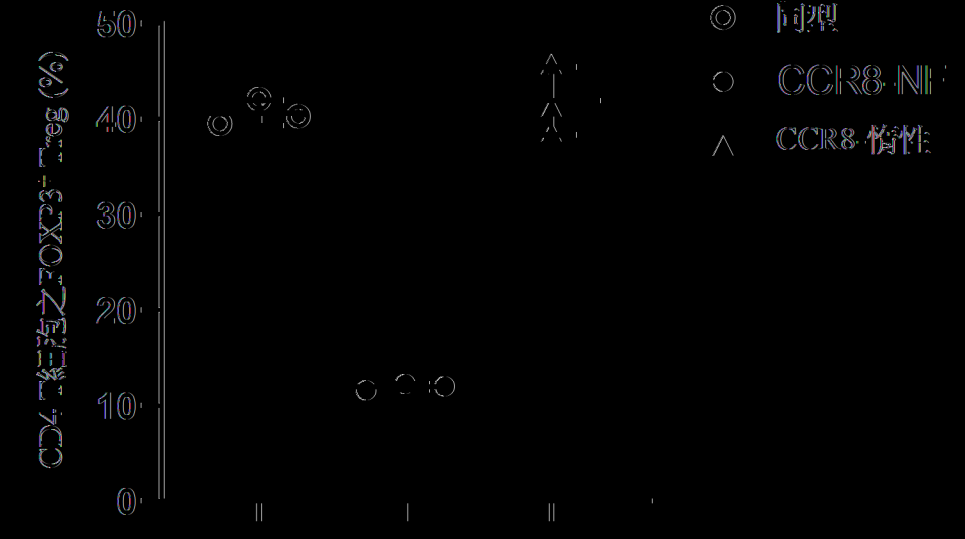

CD45+之CD4+ T細胞百分比
40
30
20
10
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
nM mAb
CCR8 mf
CCR4 mf
KHH mf

(圖20A及20B)

(C)

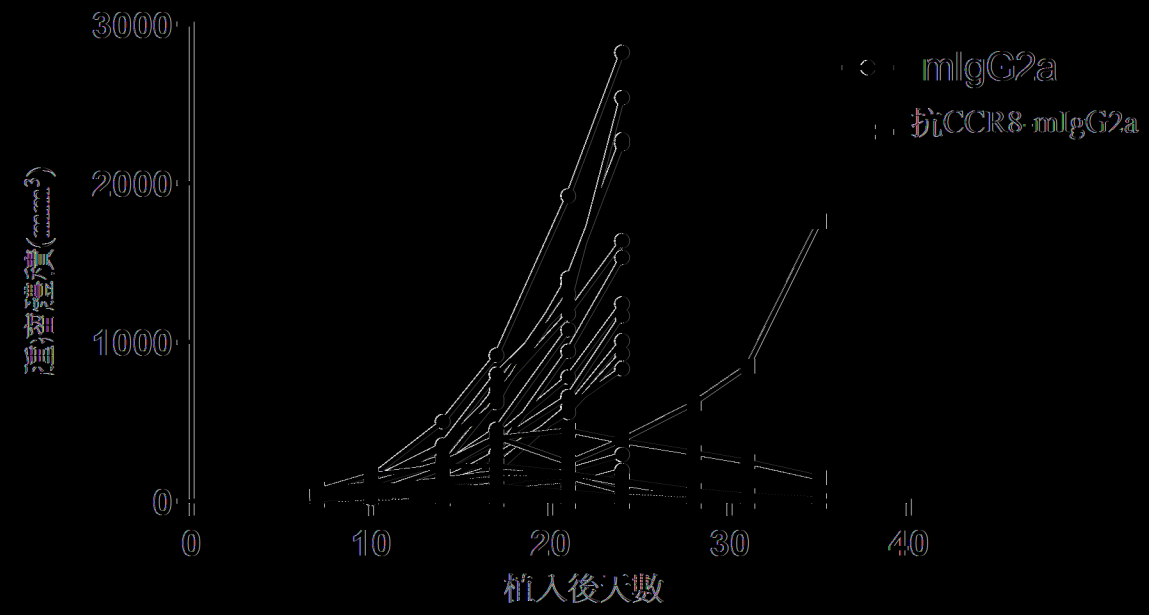

CD45-之CD8-子分群
50
40
30
20
10
0
10-3
10-2
10-1
100
101
nM mAb
CCR8-mf
CCR4-mf
KI H-mf

(D)


CD4+非活之FOXP3+Treg (%)
50
40
30
20
10
0
前測
CCR8-NI
CCR8-脩性

(同20C及20D)

A


3000
2000
1000
0
腫瘤體積(mm3)
0
10
20
30
40
植入後天數
mIgG2a
抗CCR8-mIgG2a

B

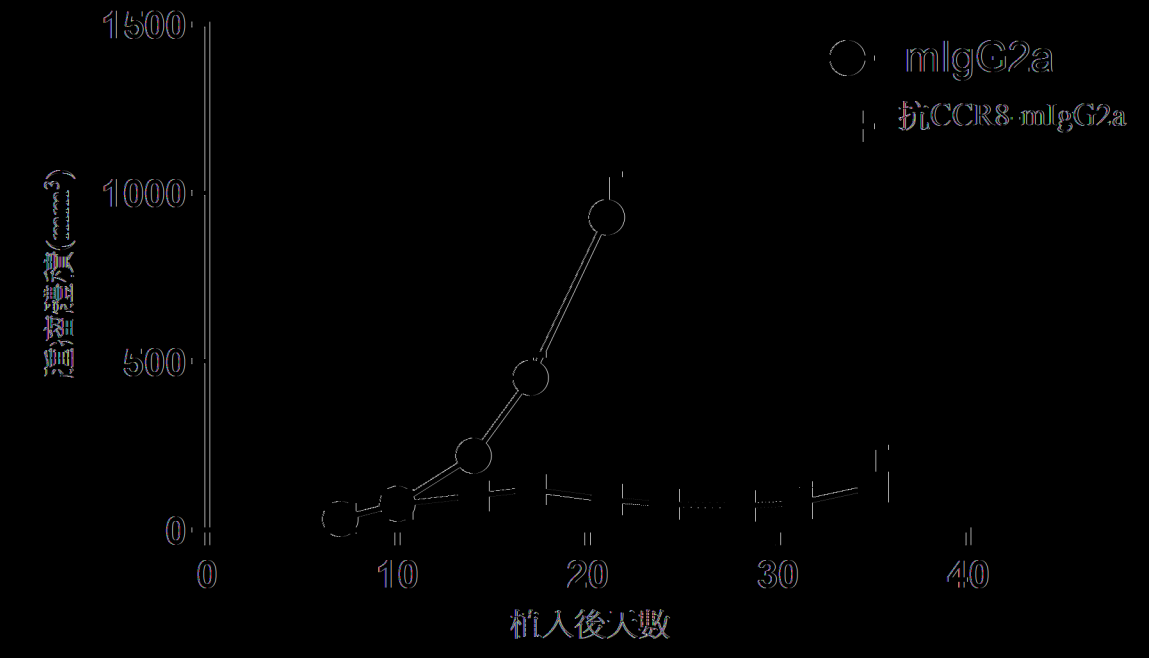
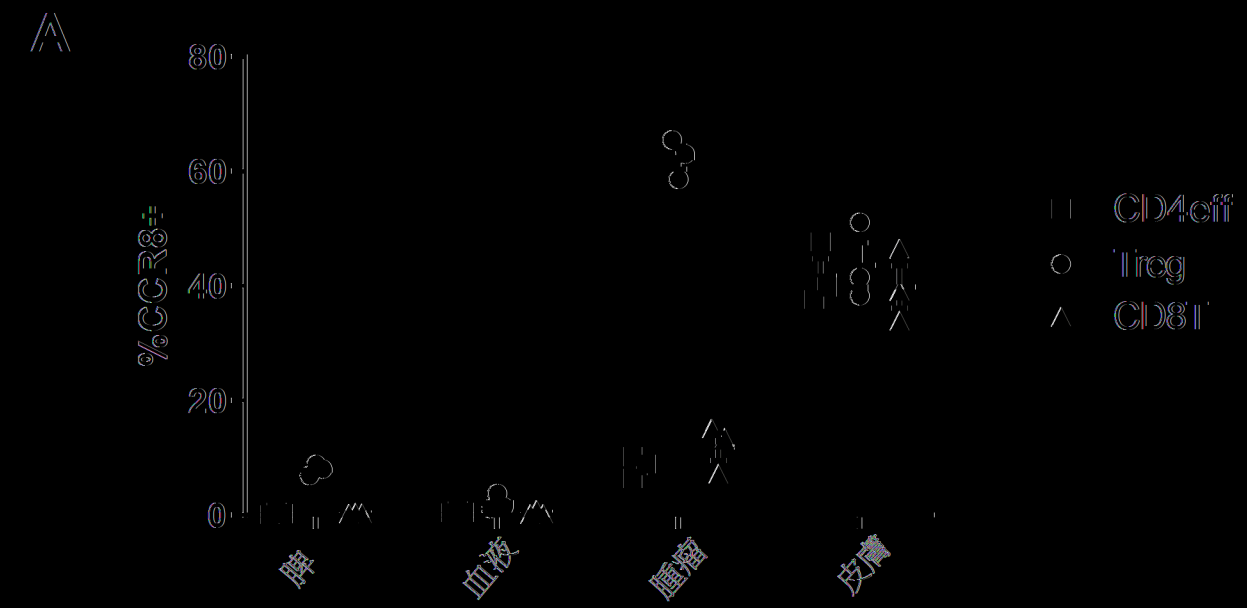
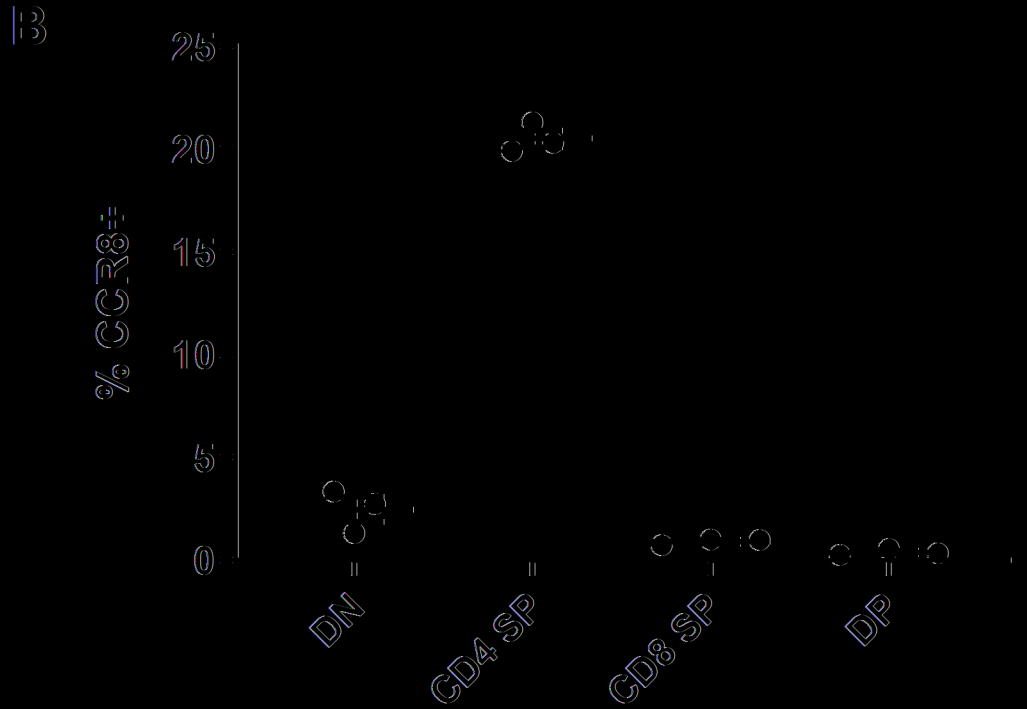

1500
1000
500
0
腫瘤體積(mm3)
0
10
20
30
40
植入後天數
mIgG2a
抗CCR8-mIgG2a

圖21A及21B

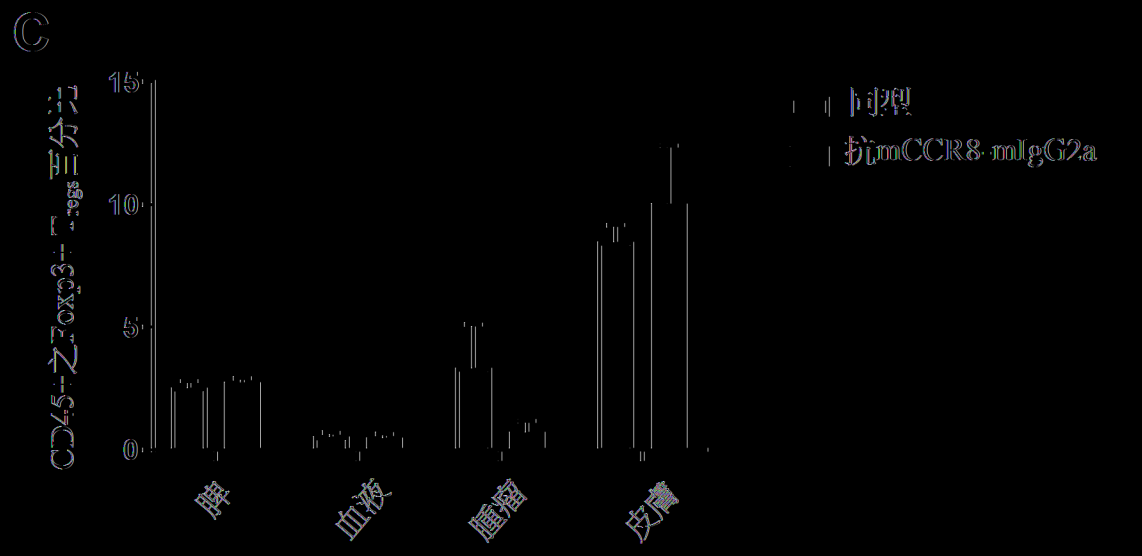
C
CD4+之Treg百分比
40
30
20
10
0
mIgG2a
a-CCR8
mIgG2a
D
CD4+之Treg百分比
40
30
20
10
0
mIgG2a
a-CCR8
mIgG2a

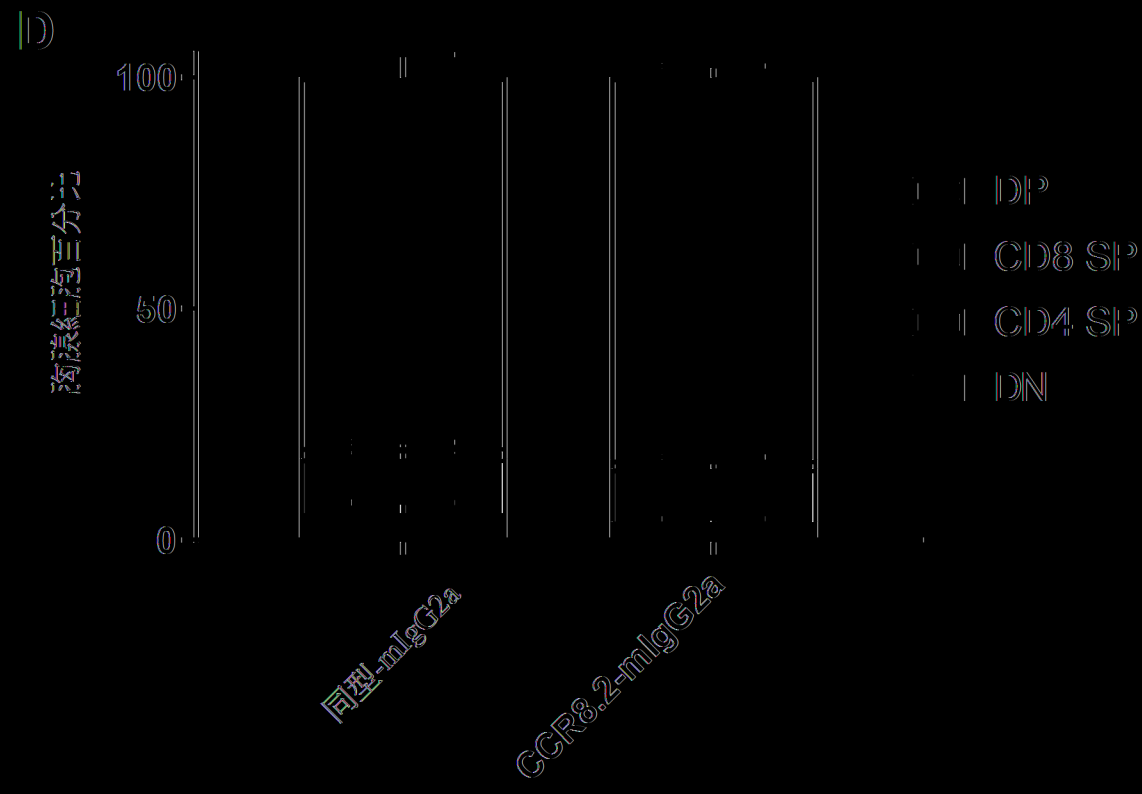
|(圖21C及21D)|


A
80
60
40
20
0
% CCR8+
脾
血液
腫瘤
皮膚
CD4eff
Treg
CD8T

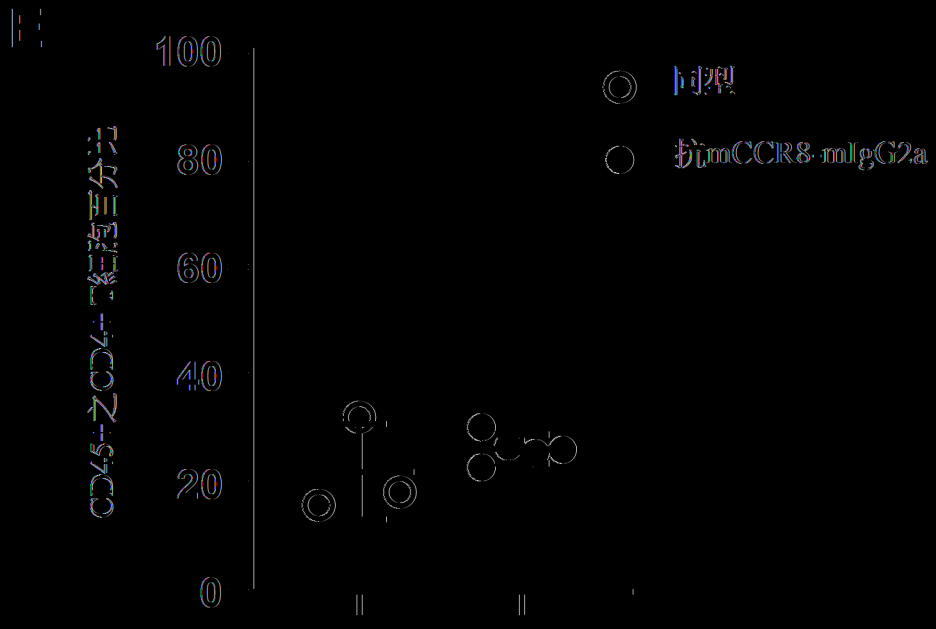

B
25
20
15
10
5
0
% CCR8+
DN
CD4 SP
CD8 SP
DP

|(圖22A及22B)|


C
15
10
5
0
脾
血液
腫瘤
皮膚
同型
抗mCCR8-mIgG2a


D
100
50
0
DP
CD8 SP
CD4 SP
DN
同型-mIgG2a
CCR8.2-mIgG2a

（圖22C及22D）


100
80
60
40
20
0
CD45+之CD4+細胞百分比
同型
抗mCCR8-mIgG2a

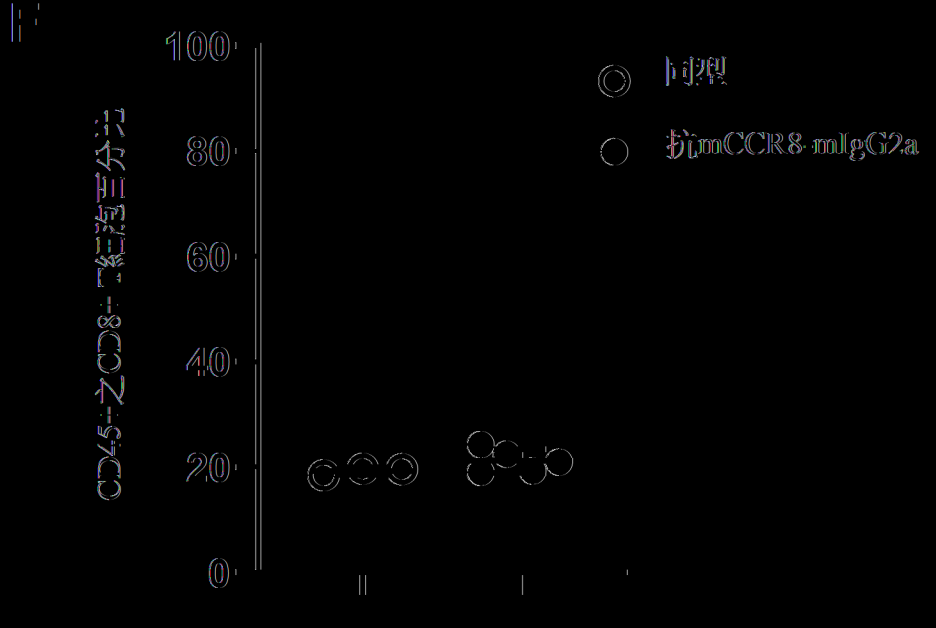
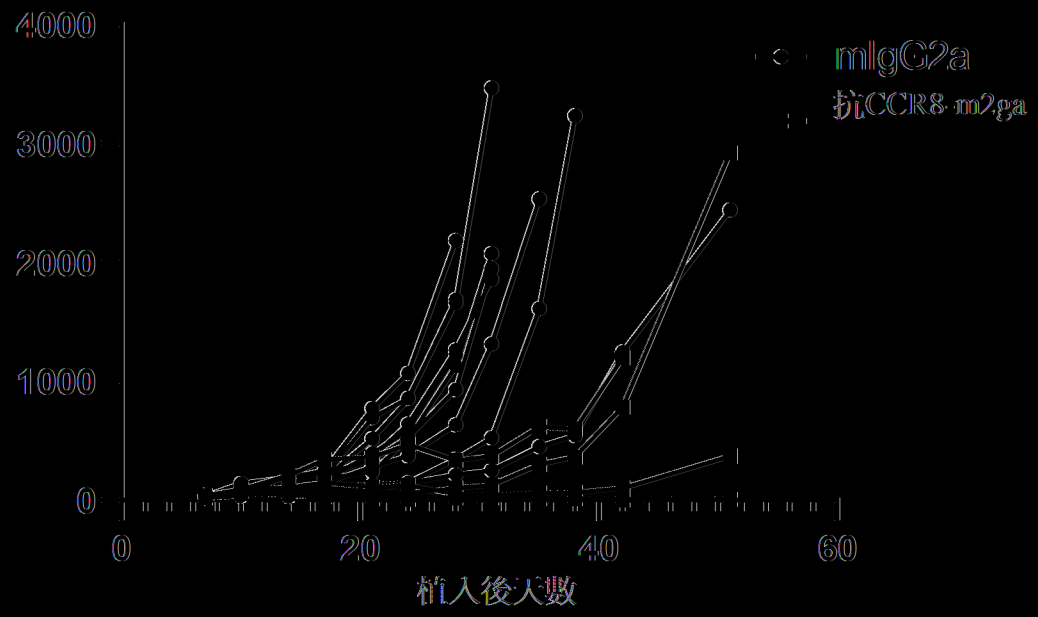
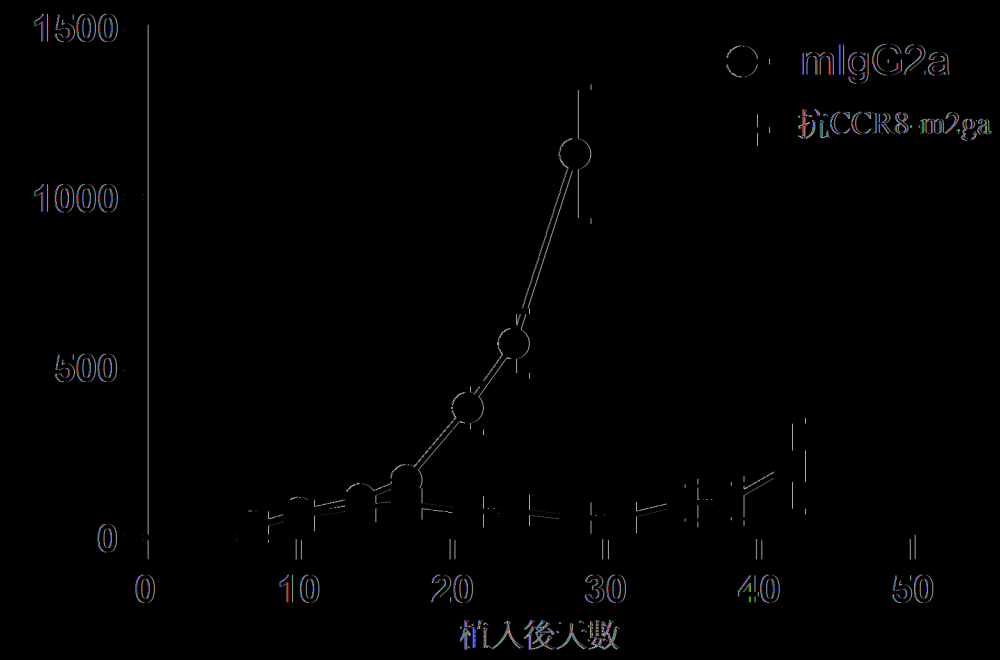

100
80
60
40
20
0
CD45+之CD8+細胞百分比
同型
抗mCCR8-mIgG2a

圖22E及22F

A


4000
3000
2000
1000
0
腫瘤體積(mm3)
0
20
40
60
植入後天數
mIgG2a
抗CCR8-m2ga

B


1500
1000
500
0
腫瘤體積(mm3)
0
10
20
30
40
50
植入後天數
mIgG2a
抗CCR8-m2ga

(圖23A及23B)

A

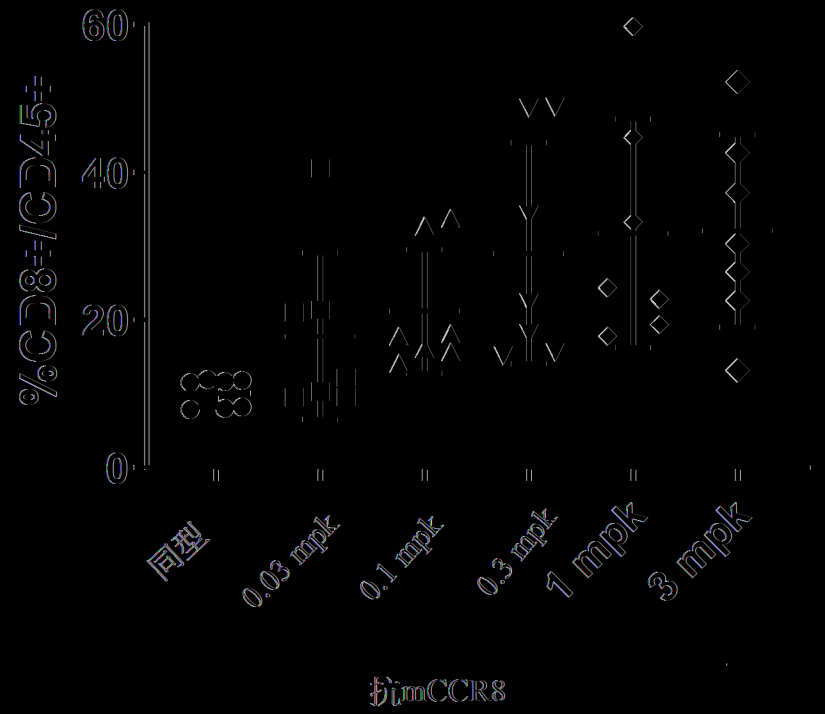
腫瘤體積(mm3)
1500
1000
500
0
同型
0.03 mpk
0.1 mpk
0.3 mpk
1 mpk
3 mpk
抗mCCR8

B

%CD3+CCR8+
80
60
40
20
0
同型
0.03 mpk
0.1 mpk
0.3 mpk
1 mpk
3 mpk
抗mCCR8

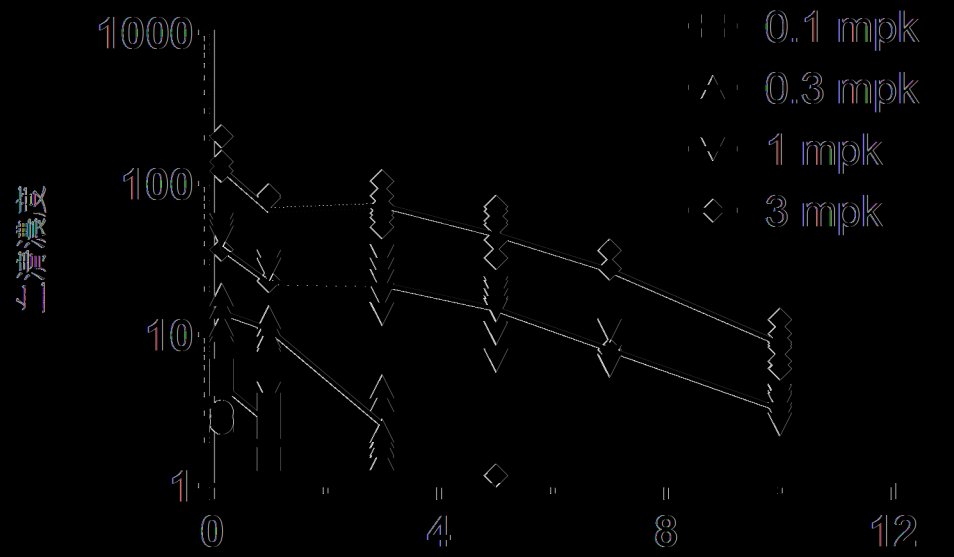
|(圖24A及24B)|

C

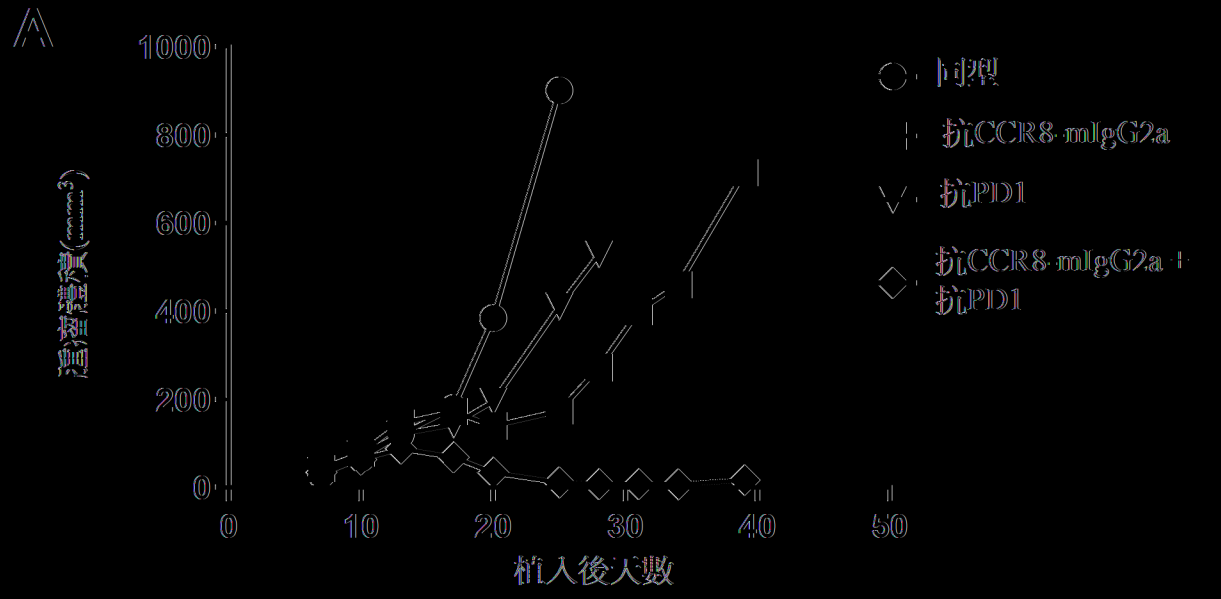


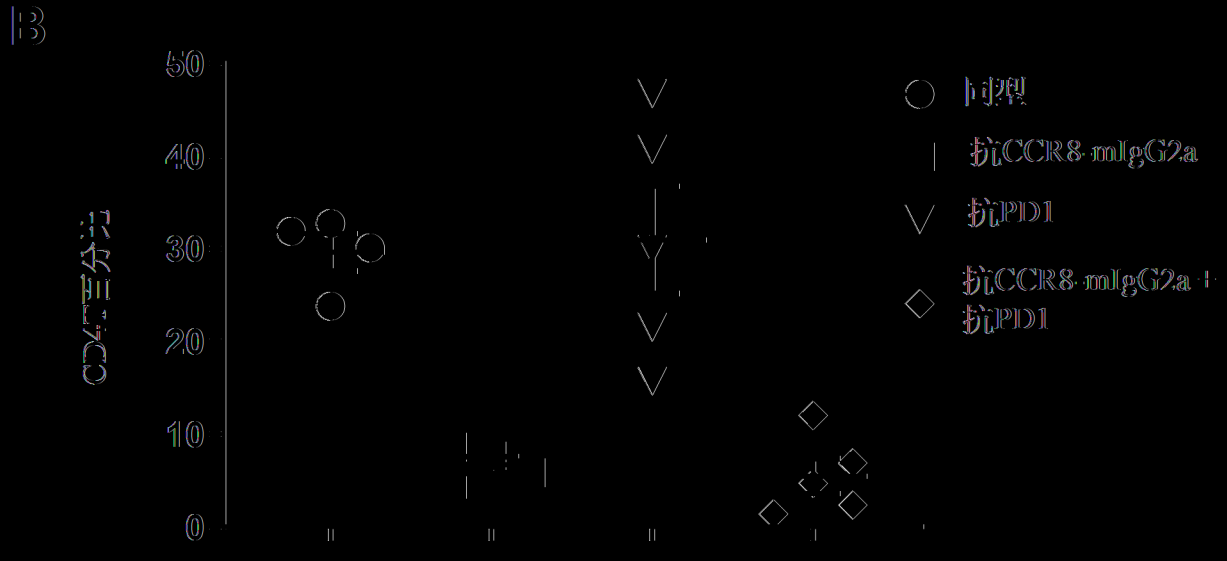
抗mCCR8

D



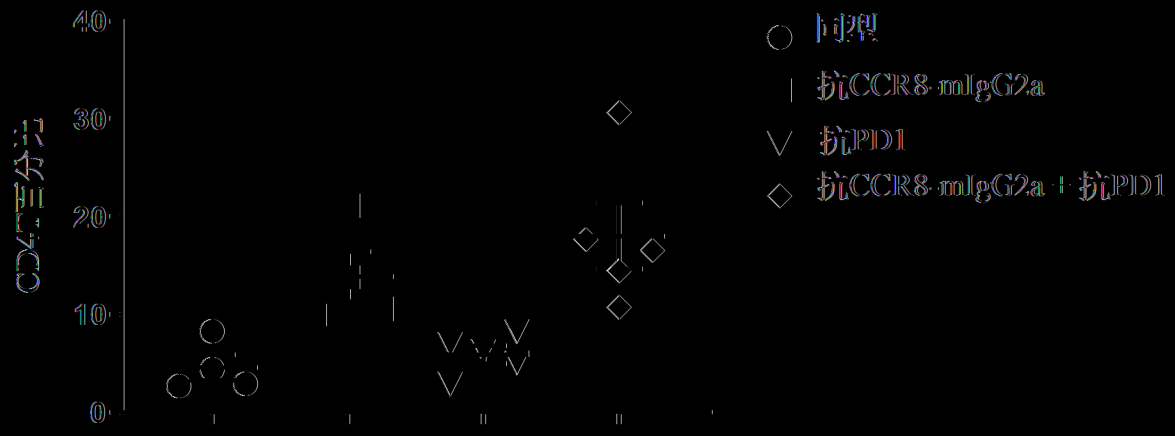
抗IL-2/IL-2複合物(包含IL-2C及IL-2D)


A
腫瘤體積(mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
植入後天數
同型
抗CCR8-mIgG2a
抗PD1
抗CCR8-mIgG2a + 抗PD1

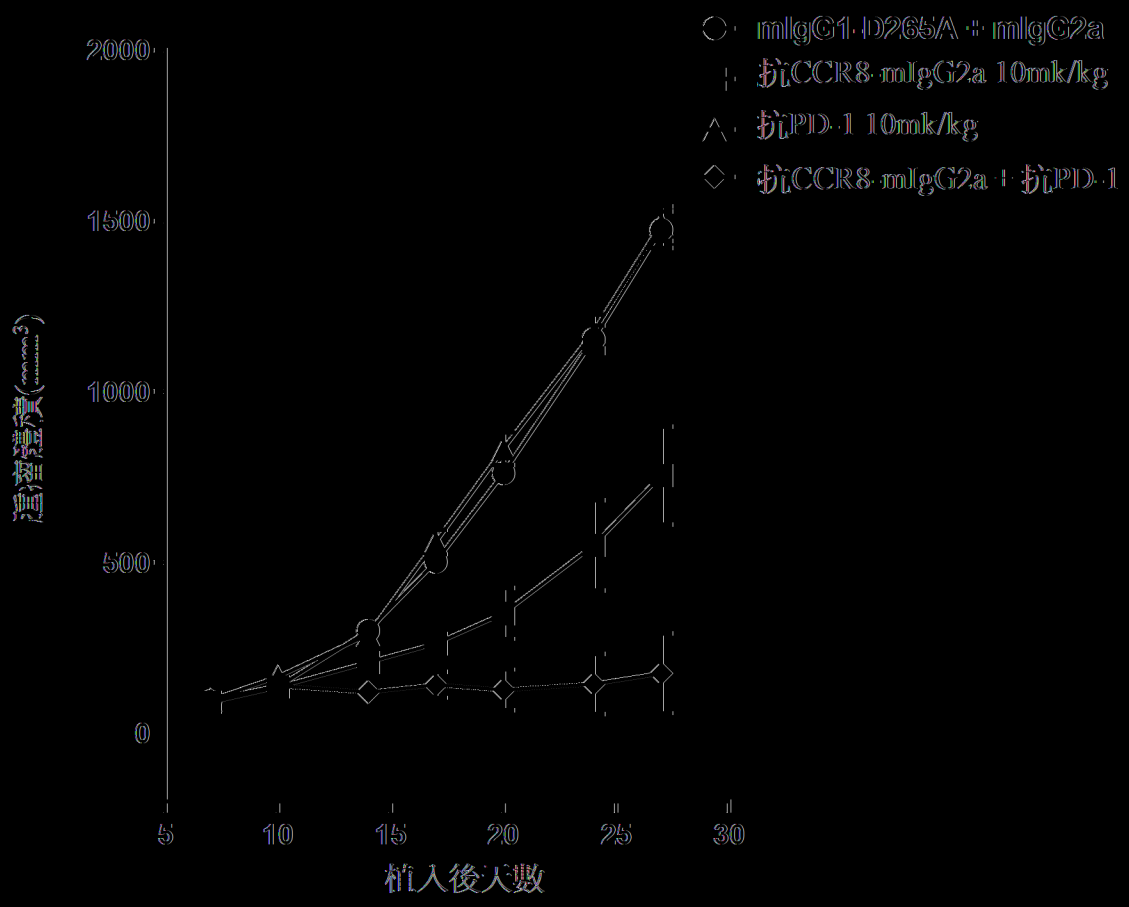

B
CD4+ T細胞%
50
40
30
20
10
0
同型
抗CCR8-mIgG2a
抗PD1
抗CCR8-mIgG2a + 抗PD1

圖(圖25A及25B)

C

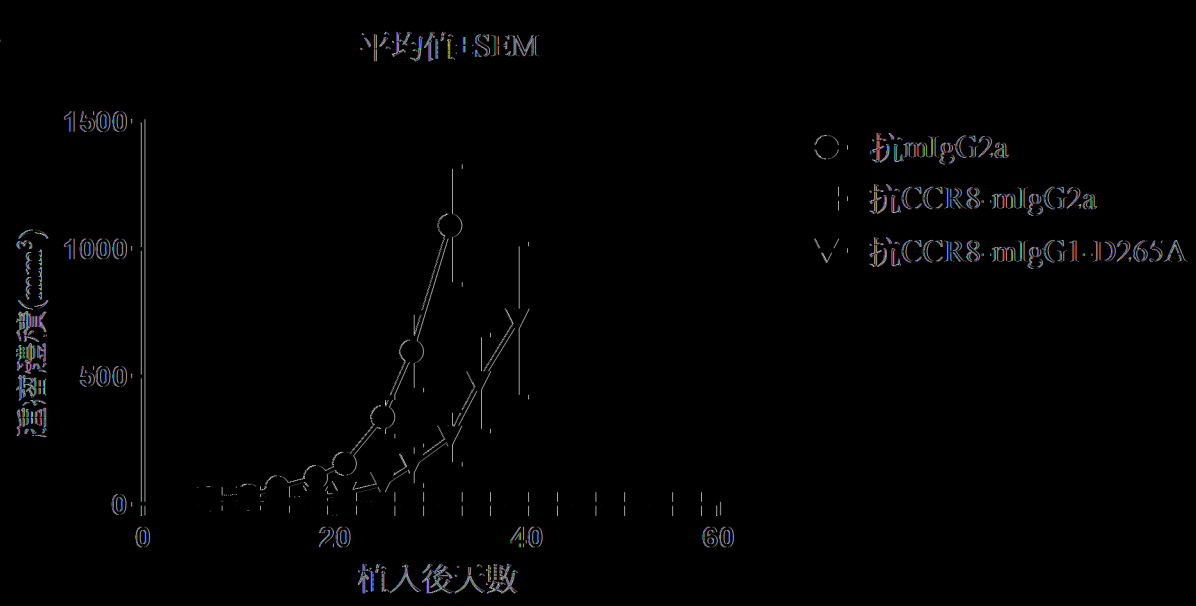

腫瘤CD8+T細胞
CD4+百分比
40
30
20
10
0
同型
抗CCR8-mIgG2a
抗PD1
抗CCR8-mIgG2a + 抗PD1

|(圖25C)|


mIgG1-D265A + mIgG2a
抗CCR8 mIgG2a 10mk/kg
抗PD-1 10mk/kg
抗CCR8 mIgG2a + 抗PD-1
腫瘤體積 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
30
植入後天數

|(圖26)|

A


平均值±SEM
腫瘤體積(mm3)
1500
1000
500
0
0
20
40
60
植入後天數
抗mIgG2a
抗CCR8-mIgG2a
抗CCR8-mIgG1-D265A

B

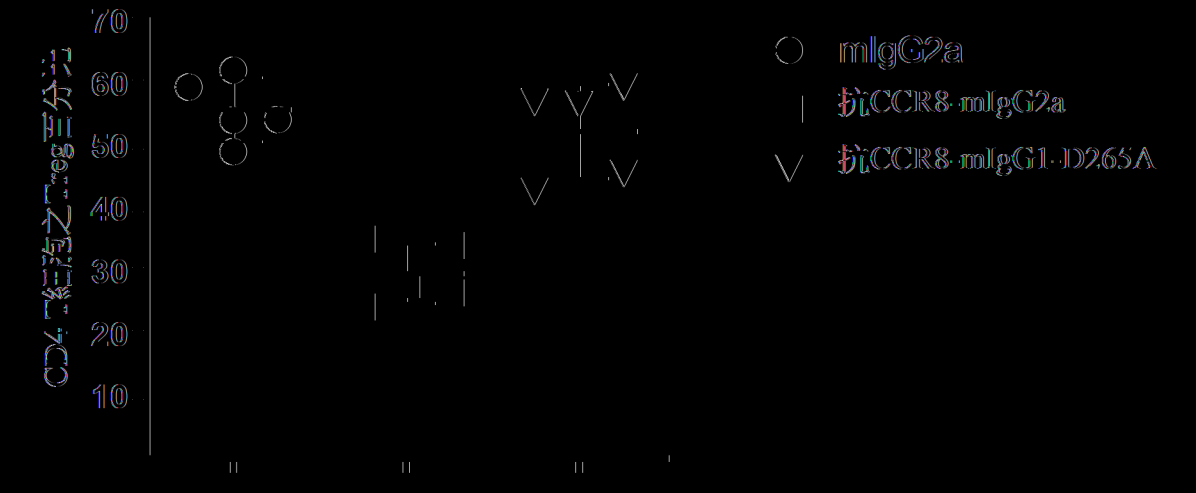
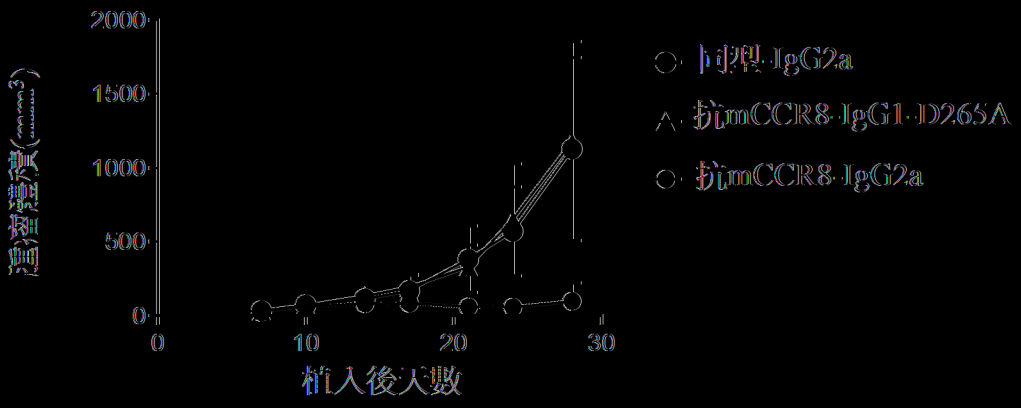

腫瘤Treg
CD4+FoxP3+之Treg細胞分化
70
60
50
40
30
20
10
mIgG2a
抗CCR8-mIgG2a
抗CCR8-mIgG1-D265A

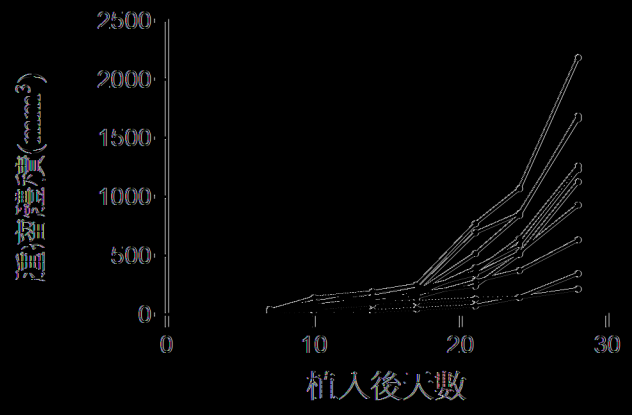
圖27A及27B

A



同型 IgG2a

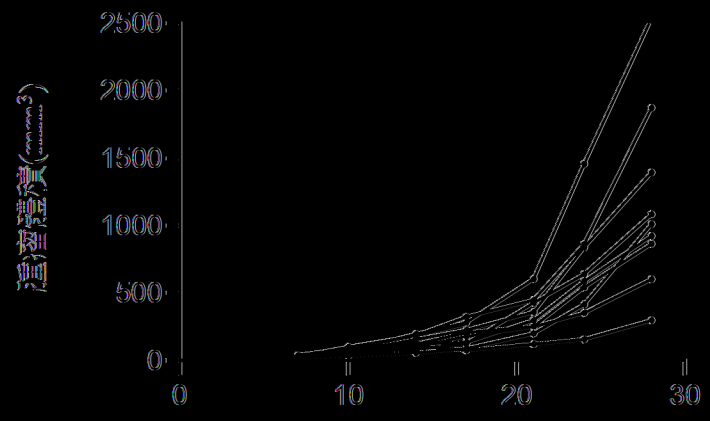
B



[圖2.8A及2.8B]

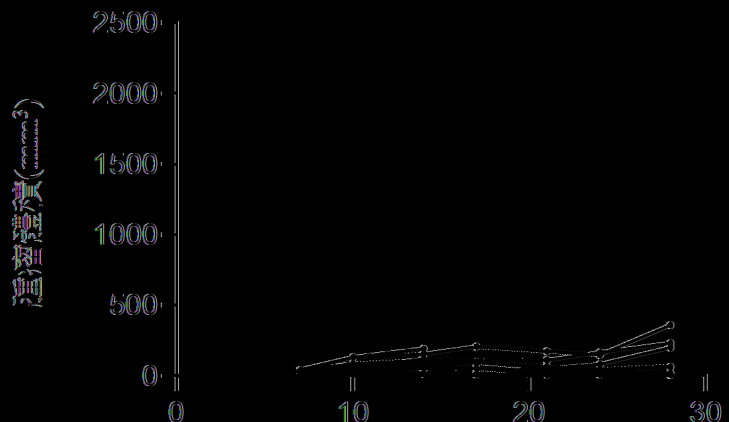
抗mCCR8-IgG1-D265A

C



抗mCCR8-IgG2a

D



(同28C及28D)

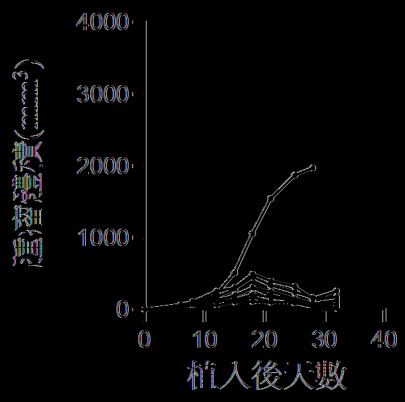
CD4+Foxp3+細胞之Treg分率
80
60
40
20
0
**
同型IgG2a
抗mCCR8-IgG2a
抗mCCR8-IgG1-D265A

供體Treg之Treg分率
60
40
20
0
**
血液
淋巴結
脾
腫瘤
WT供體
CCR8 KO供體

(同28E及28F)

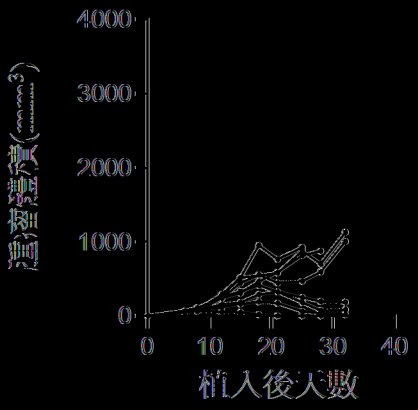
抗mCTLA-4-IgG2a

A



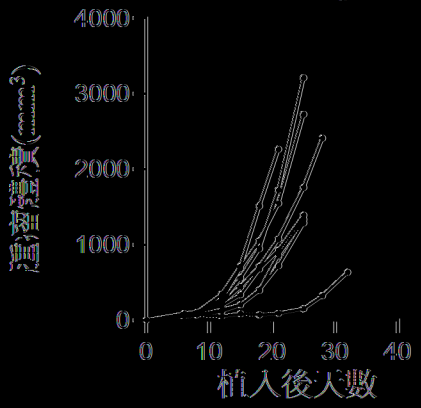
抗mCCR8-IgG2a

B



同型-IgG2a

C



【図29A-29C】

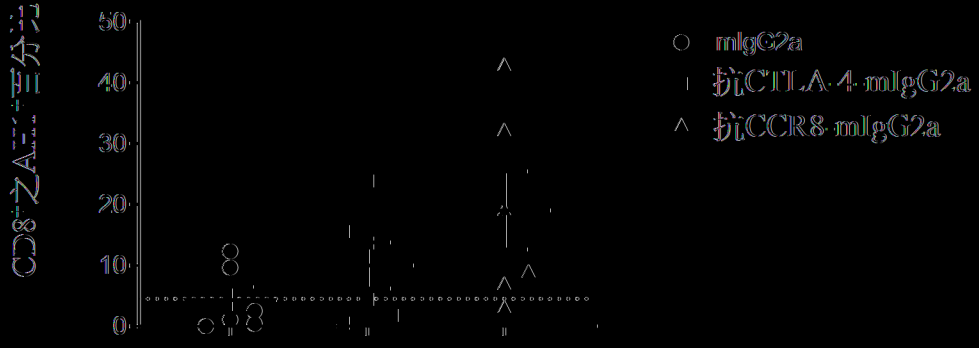
CT26 T_{reg}

(D)



CT26 AH-1+ $CD8^+$ T細胞

(E)

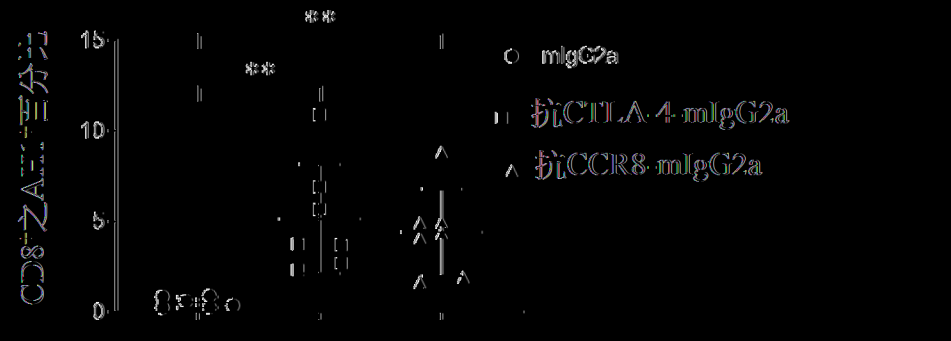


血液

植入後92天

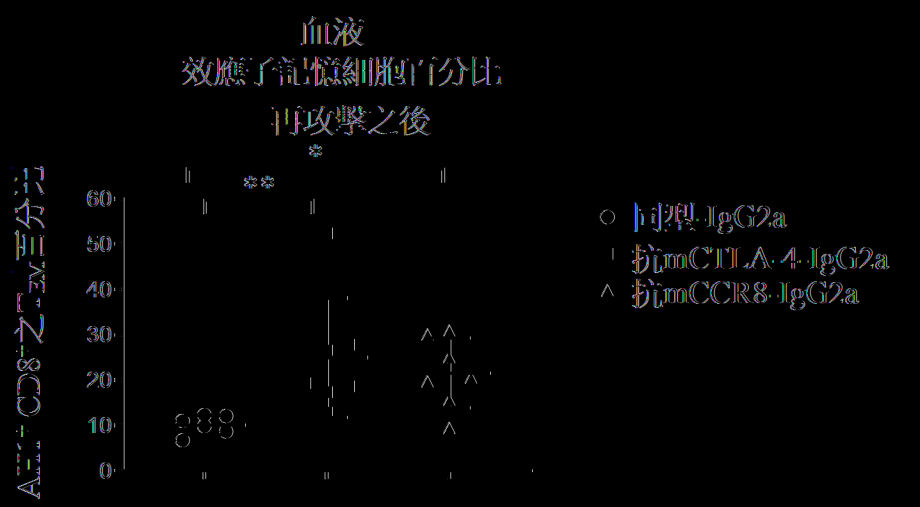
再攻擊之前

(F)

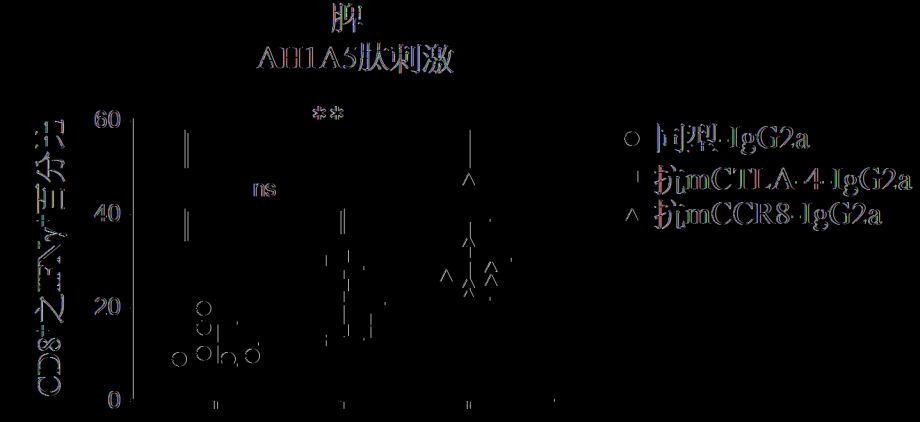


[(圖29D-29F)]

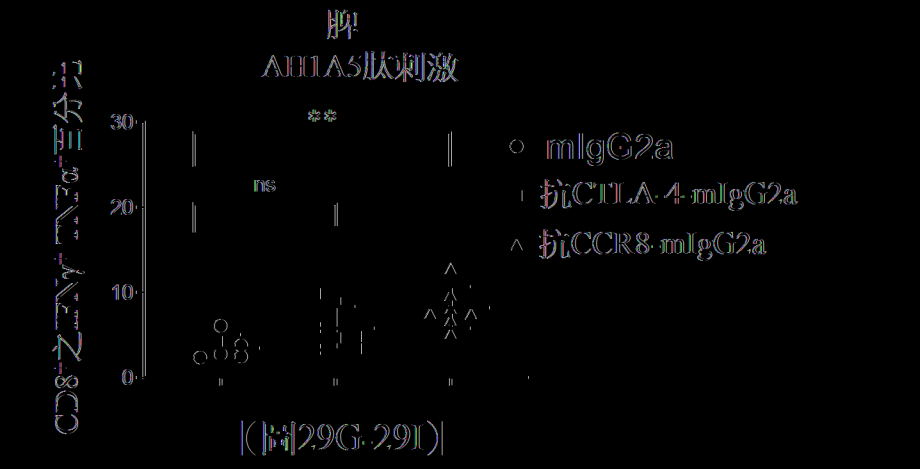
G



H

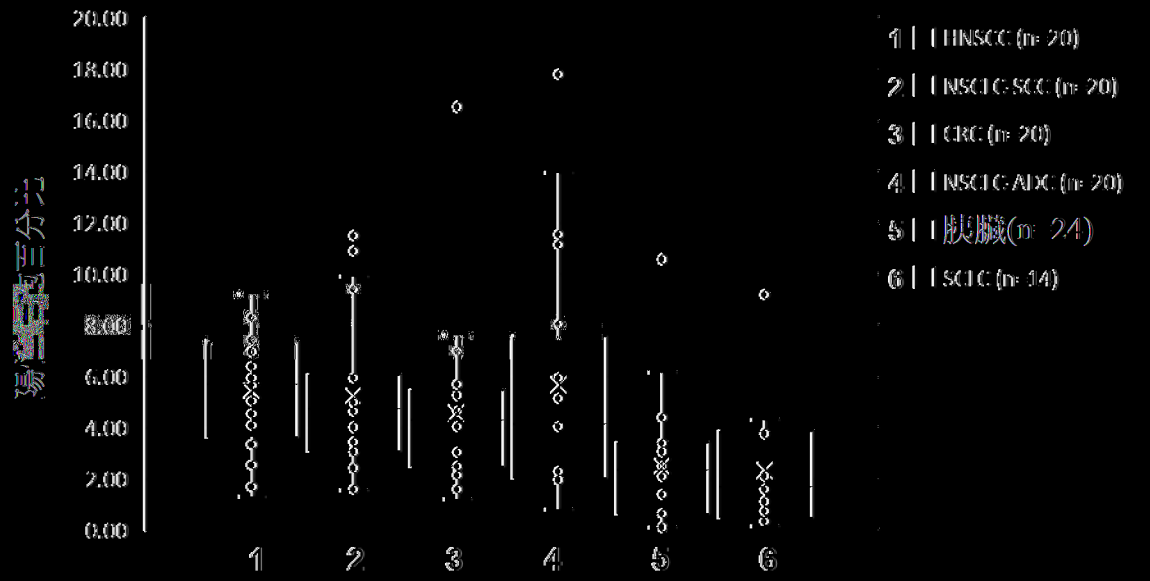


I

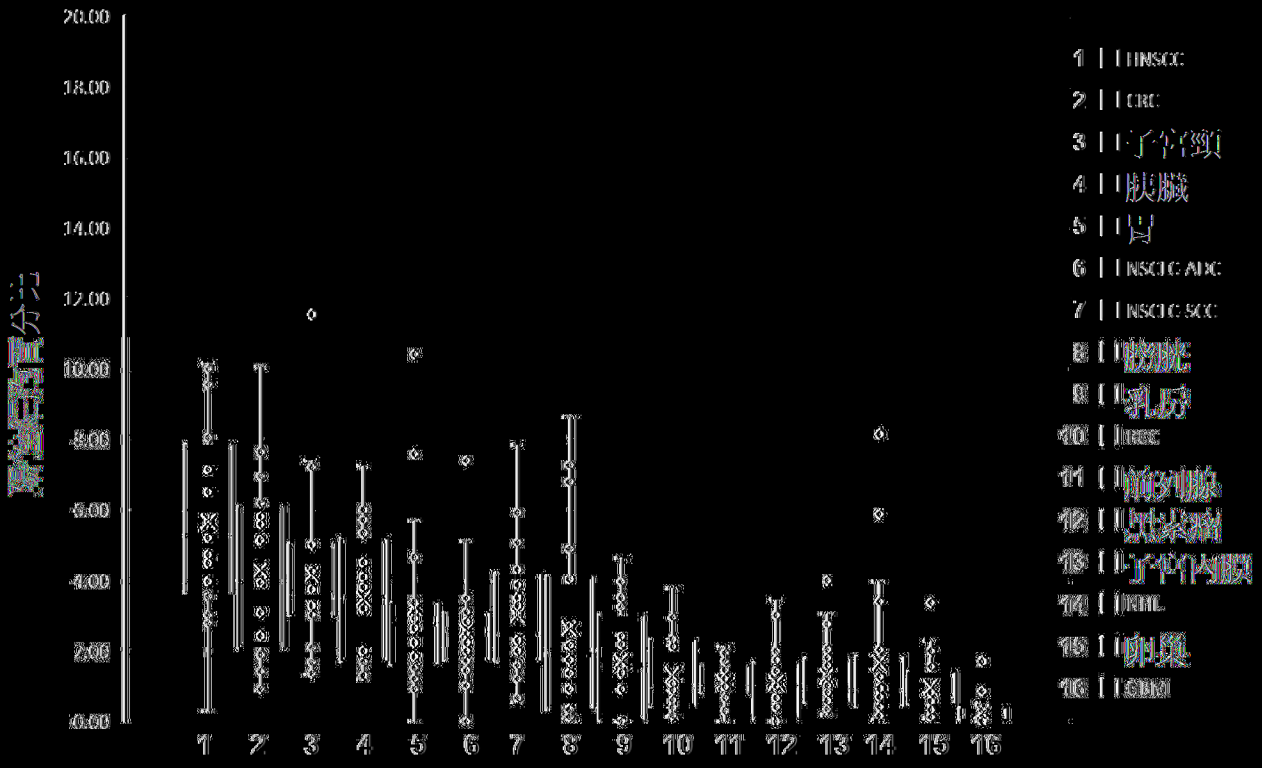


(時間29G 291)

A


20.00
18.00
16.00
14.00
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
1
2
3
4
5
6
1 | HNSCC (n= 20)
2 | NSCLC-SCC (n= 20)
3 | CRC (n= 20)
4 | NSCLC-ADC (n= 20)
5 | 胰臟(n= 24)
6 | SCLC (n= 14)

B


20.00
18.00
16.00
14.00
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
1 | HNSCC
2 | CRC
3 | 子宮頸
4 | 胰臟
5 | 胃
6 | NSCLC ADC
7 | NSCLC SCC
8 | 膀胱
9 | 乳房
10 | mesc
11 | 前列腺
12 | 卵巢癌
13 | 子宮內膜
14 | mrcc
15 | 卵巢
16 | GBM

|(圖30A及30B)|