



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115768792 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 07

(21) 申请号 202180024063.9

(22) 申请日 2021.03.22

(30) 优先权数据

62/993,570 2020.03.23 US

63/041,992 2020.06.21 US

63/157,618 2021.03.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/023430 2021.03.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/194942 EN 2021.09.30

(71) 申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 蓝尹蓉 O·A·阿德拉昆

I·巴尔曼 J·R·坎贝尔

张健哲 F·芬德森

D·M·格里纳沃尔特 R·杰恩

A·D·贾塔基亚 J·K·李

P·S·K·李 L·梁 卢恺

B·麦克唐纳 P·B·梅斯科

A·雷帕尔 S·萨班塔莫尔蒂

M·J·塞尔比 N·O·西默斯

P·斯特洛普 G·A·特拉西那

王希涛

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 黄革生 隋晓平

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书13页 说明书103页

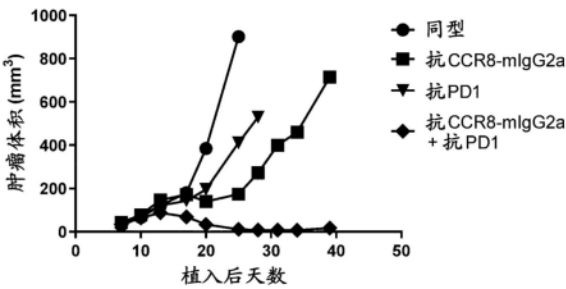
序列表46页 附图52页

(54) 发明名称

抗CCR8抗体用于治疗癌症

(57) 摘要

本发明提供了分离的抗体，例如单克隆抗体，其特异性结合表达于细胞表面上的C-C基序趋化因子受体8 (CCR8) 且通过抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 来介导表达CCR8的细胞的消耗。本发明提供用于治疗罹患癌症的个体的方法，其包含以单药疗法或与诸如免疫检查点抑制剂的抗癌剂的组合形式向个体施用治疗有效量的抗CCR8抗体，所述免疫检查点抑制剂为例如抗PD-1或抗PD-L1抗体。



1. 一种单克隆抗体或其抗原结合部分, 其特异性结合表达于细胞表面上的C-C基序趋化因子受体8 (CCR8) 且通过抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 来介导表达CCR8的细胞的消耗。

2. 如权利要求1的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其特异性结合人CCR8 (hCCR8), 所述人CCR8的序列系如SEQ ID NO:1所示。

3. 如权利要求1或2的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含属于人IgG1或IgG3同型的重链恒定区。

4. 一种包含经修饰的重链恒定区的经修饰的抗hCCR8单克隆抗体或其抗原结合部分, 其与如前述权利要求中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分相比以更高的亲和力结合Fc γ 受体 (Fc γ R) 且介导增强的ADCC, 任选地, 其介导至少:

- (a) 增强2倍的ADCC活性;
- (b) 增强5倍的ADCC活性; 或
- (c) 增强10倍的ADCC活性;

如通过实施例17中所描述的NK细胞溶解测定法中的细胞溶解的EC₅₀的降低所测量。

5. 如权利要求4的经修饰的抗hCCR8单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含呈现减少的岩藻糖基化的经修饰的IgG1重链恒定区, 任选包含低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的经修饰的IgG1重链恒定区。

6. 如权利要求4或5的经修饰的抗hCCR8单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含经修饰的IgG1重链恒定区, 所述重链恒定区含有介导增强的ADCC的一个突变或多个突变, 任选其中所述突变或所述多个突变系选自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。

7. 如前述权利要求中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其

(i) 以如通过实施例11中所描述的结合测定法所测量的以下EC₅₀特异性结合表达人CCR8的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞:

- (a) 约10nM或更低;
- (b) 约5nM或更低;
- (c) 约1.7nM或更低;
- (d) 约1nM或更低;
- (e) 约0.5nM或更低;
- (f) 约0.1nM或更低;
- (g) 约0.1nM;
- (h) 约1.7nM;
- (i) 约0.1nM与约10nM之间;
- (j) 约0.1nM与约2nM之间;
- (k) 约0.5nM与约5nM之间;
- (l) 约1nM与约2nM之间; 或
- (m) 约0.5nM与约1nM之间;

和/或

(ii) 以如通过实施例11中所描述的结合测定法所测量的以下EC₅₀特异性结合经活化的

调节性T细胞 (Treg) :

- (a) 约50nM或更低;
- (b) 约14nM或更低;
- (c) 约5nM或更低;
- (d) 约2nM或更低;
- (e) 约0.5nM或更低;
- (f) 约0.3nM或更低;
- (g) 约0.1nM或更低;
- (h) 约0.03nM或更低;
- (i) 约1.7nM;
- (j) 约0.03nM与约10nM之间;
- (k) 约0.1nM与约5nM之间;或
- (l) 约0.2nM与约2nM之间;

和/或

(iii) 以如通过实施例11中所描述的表面等离子共振 (SPR) 所测量的以下 K_D 结合包含硫酸化酪氨酸-15及酪氨酸-17残基的人CCR8的N端肽:

- (a) 约100nM或更低;
- (b) 约50nM或更低;
- (c) 约10nM或更低;
- (d) 约5nM或更低;
- (e) 约1.6nM;
- (f) 约1.0nM或更低;
- (g) 约0.5nM或更低;
- (h) 约0.1nM或更低;
- (i) 约100nM与约0.1nM之间;
- (j) 约50nM与约0.5nM之间;
- (k) 约10nM与约1nM之间;或
- (l) 约2nM与约1nM之间;

和/或

(iv) 以如通过实施例11中所描述的SPR所测量的以下 K_D 结合包含单硫酸化残基 (酪氨酸-15) 的人CCR8的N端肽:

- (a) 约100nM或更低;
- (b) 约50nM或更低;
- (c) 约25nM或更低;
- (d) 约10nM或更低;
- (e) 约1.0nM或更低;
- (f) 约20nM;
- (i) 约100nM与约1nM之间;
- (j) 约50nM与约10nM之间;或

(k) 约30nM与约20nM之间。

8. 如前述权利要求中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分,其特异性结合胸腺的髓质及皮肤的真皮中的稀少及分散的免疫细胞,但不结合人类大脑、小脑、心脏、肝脏、肺、肾脏、扁桃体、脾、胸腺、结肠、胃、胰腺、肾上腺、垂体、皮肤、外周神经、睾丸或子宫组织或外周血单个核细胞(PBMC)。

9. 如前述权利要求中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分,其进一步抑制C-C基序趋化因子配体1(CCL1)与CCR8的结合且抑制CCR8/CCL1信号传导,如通过实施例15中所描述的钙通量的抑制所测量。

10. 如前述权利要求的单克隆抗体或其抗原结合部分,其

(i) 以下列 IC_{50} 抑制CCR8/CCL1信号传导:

(a) 约10nM或更低;

(b) 约5nM或更低;

(c) 约1nM或更低;

(d) 约0.5nM或更低;

(e) 约0.1nM或更低;

(f) 约0.01nM或更低;

(g) 约0.01nM与约10nM之间;

(h) 约0.05nM与约5nM之间;

(i) 约0.1nM与约1nM之间;或

(j) 约0.46nM;

和/或

(ii) 以如通过实施例17中所描述的CD16交联测定法所测量的以下 EC_{50} 介导表达CCR8的细胞的消耗:

(a) 约100pM或更低;

(b) 约30pM或更低;

(c) 约10pM或更低;

(d) 约3pM或更低;

(e) 约1pM或更低;

(f) 约0.5pM或更低;

(g) 约0.1pM或更低;

(h) 约0.05pM或更低;

(i) 约0.7pM;

(j) 在约0.05pM与约50pM之间;

(k) 在约0.1pM与约10nM之间;

(l) 在约0.3nM与约7nM之间;或

(m) 在约0.6nM与约3nM之间;

和/或

(iii) 以如通过实施例19中所描述的细胞凋亡测定法所测量的以下 EC_{50} 介导经活化的Treg的消耗:

- (a) 约500pM或更低;
- (b) 约100pM或更低;
- (c) 约30pM或更低;
- (d) 约15pM或更低;
- (e) 约5pM或更低;
- (f) 约1pM或更低;
- (g) 约13pM;
- (h) 在约1pM与约500pM之间;
- (i) 在约5pM与约100pM之间;或
- (j) 在约10pM与约50pM之间。

11. 如前述权利要求中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合位于人CCR8的N端结构域中的表位,如通过X射线结晶学所测定,其中所述表位包含具有序列 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)的肽内的至少一个氨基酸,任选其中

(i) 所述表位包含具有序列 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)的肽内的2、3、4、5、6、7、8、9、10个或所有氨基酸;任选其中

(ii) 所述表位包含具有序列 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)的肽中的所有11个氨基酸;任选其中

(iii) 氨基酸 Y_{15} 及 Y_{17} 两者皆经硫酸化。

12. 一种单克隆抗体或其抗原结合部分,其能够介导ADCC且特异性结合人类C-C基序趋化因子受体8 (hCCR8) 上的表位,所述人类C-C基序趋化因子受体8的序列系如SEQ ID NO:1所示,其中所述表位位于hCCR8的跨越约氨基酸残基12至22的肽($V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$; SEQ ID NO:109) 内的N端结构域中,如通过X射线结晶学所测定,任选其中:

(i) 所述表位包含具有序列 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)的肽内的至少一个氨基酸;

(ii) 所述表位包含具有序列 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)的肽内的2、3、4、5、6、7、8、9、10个或所有氨基酸;

(iii) 所述表位包含具有序列 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)的肽中的所有11个氨基酸;或

(iv) 所述表位由具有序列 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)的肽中的所有11个氨基酸组成。

13. 如前述权利要求中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

(i) 当在存在或不存在交联抗体的情况下结合细胞表面上的CCR8时,所述抗体或其部分不引起CCR8的内化;和/或

(ii) 所述抗体或其部分在体外促进人类肿瘤相关Treg的消耗;和/或

(iii) 所述抗体或其部分特异性诱导肿瘤Treg的消耗而不消耗非肿瘤组织中的CCR8⁺T细胞,任选其中所述非肿瘤组织为皮肤、胸腺、脾或血液;和/或

(iv) 当以单药疗法形式施用于个体时,所述抗体或其部分抑制所述个体中的肿瘤细胞的生长;和/或

(v) 当与其他用于治疗癌症的治疗剂组合施用于个体时,所述抗体或其部分抑制所述

个体中的肿瘤细胞的生长。

14. 如前述权利要求中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分,其呈现以下特性中的至少一种、两种、三种、四种、五种或六种:

- (a) 以约2nM或更低的 EC_{50} 特异性结合表达于细胞表面上的CCR8;
- (b) 特异性结合胸腺的髓质及皮肤的真皮中的稀少及分散的免疫细胞,但不结合人大脑、小脑、心脏、肝脏、肺、肾脏、扁桃体、脾、胸腺、结肠、胃、胰腺、肾上腺、垂体、皮肤、外周神经、睾丸或子宫组织或外周血单个核细胞(PBMC);
- (c) 以约5nM或更低的 IC_{50} 抑制CCL1与CCR8的结合及抑制CCR8/CCL1信号传导;
- (d) 当结合细胞表面上的CCR8时,以约10pM或更低的 EC_{50} 介导所述细胞的消耗;
- (e) 当在存在或不存在交联抗体的情况下结合细胞表面上的CCR8时,不引起CCR8的内化;
- (f) 使用实施例22中描述的测定法,在体外促进人类肿瘤相关Treg的消耗;
- (g) 使用实施例20中描述的测定法,促进离体人类肿瘤切片样品中的人类肿瘤相关Treg的消耗;
- (h) 特异性介导肿瘤Treg的消耗,同时避开非肿瘤组织中的CCR8⁺T细胞;
- (i) 当以单药疗法形式施用于个体时,抑制所述个体中的肿瘤细胞的生长;及
- (j) 当与其他用于治疗癌症的治疗剂组合施用于个体时,抑制所述个体中的肿瘤细胞的生长;任选地其中所述单克隆抗体或其抗原结合部分呈现所有所述那些特性。

15. 如权利要求34或35的单克隆抗体或其抗原结合部分,其进一步以约10nM或更低的 K_D 结合位于人CCR8的N端结构域中的表位,其中所述表位包含肽,所述肽具有序列 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)以及硫酸化酪氨酸-15及酪氨酸-17残基。

16. 一种包含经修饰的重链恒定区的经修饰的抗hCCR8单克隆抗体或其抗原结合部分,其与如权利要求14或15的单克隆抗体或其抗原结合部分相比以更高的亲和力结合Fc γ 受体(Fc γ R)且介导增强至少2、5或10倍的ADCC。

17. 如前述权利要求中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分,其与参考抗体结合相同表位,其中所述参考抗体包含:

- (a) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:3所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:15所示序列的连续连接的氨基酸;
- (b) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸;
- (c) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:5所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:17所示序列的连续连接的氨基酸;
- (d) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸;
- (e) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:7所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:19所示序列的连续连接的氨基酸;
- (f) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:8所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:20所示序列的连续连接的氨基酸;
- (g) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如

SEQ ID NO:21所示序列的连续连接的氨基酸；

(h) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:10所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:22所示序列的连续连接的氨基酸；

(i) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:11所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:23所示序列的连续连接的氨基酸；

(j) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:12所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:24所示序列的连续连接的氨基酸；

(k) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:13所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:25所示序列的连续连接的氨基酸；

(l) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:14所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:26所示序列的连续连接的氨基酸；或

(m) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸。

18. 如前述权利要求中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分，其与参考抗体交叉竞争结合hCCR8，其中所述参考抗体包含：

(a) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:3所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:15所示序列的连续连接的氨基酸；

(b) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸；

(c) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:5所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:17所示序列的连续连接的氨基酸；

(d) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸；

(e) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:7所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:19所示序列的连续连接的氨基酸；

(f) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:8所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:20所示序列的连续连接的氨基酸；

(g) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:21所示序列的连续连接的氨基酸；

(h) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:10所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:22所示序列的连续连接的氨基酸；

(i) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:11所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:23所示序列的连续连接的氨基酸；

(j) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:12所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:24所示序列的连续连接的氨基酸；

(k) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:13所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:25所示序列的连续连接的氨基酸；

(l) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:14所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:26所示序列的连续连接的氨基酸；或

(m) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸。

19. 如前述权利要求中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含以下中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3结构域:

(a) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:3所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:15所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸;

(c) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:5所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:17所示序列的连续连接的氨基酸;

(d) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸;

(e) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:7所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:19所示序列的连续连接的氨基酸;

(f) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:8所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:20所示序列的连续连接的氨基酸;

(g) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:21所示序列的连续连接的氨基酸;

(h) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:10所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:22所示序列的连续连接的氨基酸;

(i) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:11所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:23所示序列的连续连接的氨基酸;

(j) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:12所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:24所示序列的连续连接的氨基酸;

(k) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:13所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:25所示序列的连续连接的氨基酸;

(l) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:14所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:26所示序列的连续连接的氨基酸; 或

(m) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸。

20. 如权利要求19的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含如通过Kabat方法所定义的以下CDR结构域:

(a) 重链可变区CDR1, 其包含具有如SEQ ID NO:27所示序列的连续连接的氨基酸; 重链可变区CDR2, 其包含具有如SEQ ID NO:28所示序列的连续连接的氨基酸; 重链可变区CDR3, 其包含具有如SEQ ID NO:29所示序列的连续连接的氨基酸; 轻链可变区CDR1, 其包含具有如SEQ ID NO:30所示序列的连续连接的氨基酸; 轻链可变区CDR2, 其包含具有如SEQ ID NO:31所示序列的连续连接的氨基酸; 及轻链可变区CDR3, 其包含具有如SEQ ID NO:32所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) 重链可变区CDR1, 其包含具有如SEQ ID NO:33所示序列的连续连接的氨基酸; 重链

N0:73所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID N0:74所示序列的连续连接的氨基酸;

(i) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID N0:75所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID N0:76所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID N0:77所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID N0:78所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID N0:79所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID N0:80所示序列的连续连接的氨基酸;

(j) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID N0:81所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID N0:82所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID N0:83所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID N0:84所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID N0:85所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID N0:86所示序列的连续连接的氨基酸;

(k) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID N0:87所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID N0:88所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID N0:89所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID N0:90所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID N0:91所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID N0:92所示序列的连续连接的氨基酸;

(l) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID N0:93所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID N0:94所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID N0:95所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID N0:96所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID N0:97所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID N0:98所示序列的连续连接的氨基酸;或

(m) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID N0:103所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID N0:104所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID N0:105所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID N0:106所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID N0:107所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID N0:108所示序列的连续连接的氨基酸。

21. 如权利要求19或20的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:

(a) V_H ,其包含具有如SEQ ID N0:3所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID N0:15所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) V_H ,其包含具有如SEQ ID N0:4所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID N0:16所示序列的连续连接的氨基酸;

(c) V_H ,其包含具有如SEQ ID N0:5所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID N0:17所示序列的连续连接的氨基酸;

(d) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸;

(e) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:7所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:19所示序列的连续连接的氨基酸;

(f) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:8所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:20所示序列的连续连接的氨基酸;

(g) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:21所示序列的连续连接的氨基酸;

(h) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:10所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:22所示序列的连续连接的氨基酸;

(i) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:11所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:23所示序列的连续连接的氨基酸;

(j) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:12所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:24所示序列的连续连接的氨基酸;

(k) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:13所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:25所示序列的连续连接的氨基酸;

(l) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:14所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:26所示序列的连续连接的氨基酸; 或

(m) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸。

22. 如权利要求20或21的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含:

(a) 重链, 其包含具有如SEQ ID NO:99所示序列的连续连接的氨基酸, 及轻链, 其包含具有如SEQ ID NO:111所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) 重链, 其包含具有如SEQ ID NO:100所示序列的连续连接的氨基酸, 及轻链, 其包含具有如SEQ ID NO:112所示序列的连续连接的氨基酸;

(c) 重链, 其包含具有如SEQ ID NO:101所示序列的连续连接的氨基酸, 及轻链, 其包含具有如SEQ ID NO:113所示序列的连续连接的氨基酸;

(d) 重链, 其包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸, 及轻链, 其包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸;

(e) 重链, 其包含具有如SEQ ID NO:117所示序列的连续连接的氨基酸, 及轻链, 其包含具有如SEQ ID NO:118所示序列的连续连接的氨基酸; 或

(f) 重链, 其包含具有如SEQ ID NO:110所示序列的连续连接的氨基酸, 及轻链, 其包含具有如SEQ ID NO:119所示序列的连续连接的氨基酸。

23. 如前述权利要求中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其为嵌合抗体、人源化抗体、人抗体或其片段。

24. 一种免疫偶联物, 其包含连接至细胞溶解剂的如前述权利要求中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分, 任选其中所述细胞溶解剂为细胞毒素或放射性同位素。

25. 一种双特异性分子, 其包含连接至结合域的如权利要求1至23中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分, 所述结合域具有与所述单克隆抗体或其抗原结合部分不同的结合特

异性。

26. 一种组合物,其包含:

- (a) 如权利要求1至23中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分;
 - (b) 如权利要求24的免疫偶联物;或
 - (c) 如权利要求25的双特异性分子,
- 及药学上可接受的载体。

27. 一种分离的核酸,其编码如权利要求1至23中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分。

28. 一种表达载体,其包含如权利要求27的核酸。

29. 一种宿主细胞,其包含如权利要求28的表达载体。

30. 一种用于制备抗CCR8抗体或其抗原结合部分的方法,其包含在如权利要求29的宿主细胞中表达所述抗体或其抗原结合部分及自所述宿主细胞分离所述抗体或其抗原结合部分。

31. 一种用于治疗罹患癌症的个体的方法,其包含向所述个体施用治疗有效量的如权利要求1至23中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分、如权利要求24的免疫偶联物、如权利要求25的双特异性分子或如权利要求26的药物组合物,使得所述个体得到治疗。

32. 一种用于抑制个体中的肿瘤细胞的生长的方法,其包含向个体施用治疗有效量的如权利要求1至23中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分、如权利要求24的免疫偶联物、如权利要求25的双特异性分子或如权利要求26的药物组合物,使得抑制所述个体中的肿瘤细胞的生长。

33. 如权利要求31或32的方法,其中所述方法进一步包含向所述个体施用治疗有效量的其他用于治疗癌症的治疗剂,任选其中所述其他治疗剂为降低免疫系统的抑制或增加免疫系统的刺激的化合物。

34. 如权利要求31至33中任一项的方法,其中所述个体为人类。

35. 如权利要求31至34中任一项的方法,其中:

(a) 所述癌症为实体肿瘤,任选其中所述实体肿瘤为:

(i) 选自以下的癌症:鳞状细胞癌、小细胞肺癌 (SCLC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、鳞状 NSCLC、非鳞状 NSCLC、头颈癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胃肠癌、小肠癌、肝癌、肝细胞癌 (HCC)、胰腺癌 (PAC)、肾癌、肾细胞癌 (RCC)、膀胱癌、尿道癌、输尿管癌、结肠直肠癌 (CRC)、结肠癌、结肠恶性肿瘤、肛门区癌、子宫内膜癌、前列腺癌、纤维肉瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤、神经胶母细胞瘤、生殖细胞肿瘤、儿童肉瘤、鼻腔鼻窦自然杀伤细胞、黑素瘤、皮肤癌、骨癌、子宫颈癌、子宫癌、子宫内膜恶性肿瘤、输卵管癌、卵巢癌、子宫颈恶性肿瘤、阴道癌、外阴癌、睾丸癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、阴茎癌、肾盂恶性肿瘤、中枢神经系统 (CNS) 新生物 (neoplasm)、原发性 CNS 淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊椎轴肿瘤、脑癌、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma)、表皮样癌症、鳞状细胞癌症、儿童实体肿瘤、环境诱导的癌症、病毒相关癌症、病毒性来源癌症、晚期癌症、不可切除性癌症、转移性癌症、难治性癌症、复发性癌症及其任何组合;或

(ii) 选自以下的癌症:非小细胞肺癌 (NSCLC)、头部及颈部的鳞状细胞癌 (SCCHN)、结肠直肠癌 (CRC)、胃癌、胃食道 (GE) 接合区癌症及子宫颈癌;或

(iii) 选自以下的癌症：头颈部鳞状细胞癌 (HNSC)、肺腺癌 (LUAD)、胃腺癌 (STAD)、肺鳞状细胞癌 (LUSC)、胰腺腺癌 (PAAD)、直肠腺癌 (READ)、食道癌 (ESCA)、乳腺侵袭性癌 (breast invasive carcinoma, BRCA)、结肠腺癌 (COAD) 以及子宫颈鳞状细胞癌及子宫颈内腺癌 (CESC)；或

(iv) 选自以下的癌症：头部及颈部的鳞状细胞癌 (SCCHN)、子宫颈癌、结肠直肠癌 (CRC)、非小细胞肺癌-鳞状细胞癌 (NSCLC-SCC)、NSCLC-腺癌 (NSCLC-ADC)、胰腺癌、胃癌、膀胱癌及乳腺癌；或

(v) 选自以下的癌症：结肠腺癌、膀胱癌、乳腺癌 (mammary carcinoma) 及纤维肉瘤；或

(b) 所述癌症为血液恶性肿瘤或所述等肿瘤细胞为血液恶性肿瘤的细胞，任选其中所述血液恶性肿瘤系选自急性淋巴母细胞性白血病 (ALL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、慢性骨髓性白血病 (CML)、T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤 (HL)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、多发性骨髓瘤、冒烟型骨髓瘤、意义不明单克隆伽玛球蛋白症 (MGUS)、晚期、转移性、难治性和/或复发性血液系统肿瘤，以及所述等血液系统恶性肿瘤的任何组合。

36. 如权利要求31的方法，其中所述其他治疗剂为：

(a) 拮抗剂，其特异性结合程序性死亡-1 (PD-1)、程序性死亡配体-1 (PD-L1)、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4)、淋巴细胞活化基因-3 (LAG-3)、B及T淋巴细胞衰减因子 (BTLA)、T细胞免疫球蛋白及黏蛋白域-3 (TIM-3)、杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR)、杀伤细胞凝集素样受体G1 (KLRG-1)、腺苷A2a受体 (A2aR)、具有Ig及ITIM域的T细胞免疫受体 (TIGIT)、T细胞活化的V结构域Ig抑制因子 (VISTA)、原癌基因酪氨酸-蛋白质激酶MER (MerTK)、自然杀伤细胞受体2B4 (CD244) 或CD160；或

(b) 激动剂，其特异性结合可诱导的T细胞共刺激剂 (ICOS)、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40)、CD27、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白 (GITR) 或疱疹病毒侵入介体 (HVEM)；及任选其中：

(i) 所述特异性结合PD-1的拮抗剂系选自纳武单抗 (nivolumab)、派姆单抗 (pembrolizumab)、西米普利单抗 (cemiplimab)、斯巴达珠单抗 (spartalizumab)、卡瑞利珠单抗 (camrelizumab)、信迪利单抗 (sintilimab)、替雷利珠单抗 (tislevlizumab) 及特瑞普利单抗 (toripalimab)；或

(ii) 所述特异性结合PD-L1的拮抗剂系选自阿特珠单抗 (atezolizumab)、德瓦鲁单抗 (durvalumab)、艾维路单抗 (avelumab)、恩沃利单抗 (envafolimab)、BMS-936559、CK-301、CS-1001、SHR-1316、CBT-502及BGB-A333；或

(iii) 所述特异性结合CTLA-4的拮抗剂为伊匹单抗 (ipilimumab) 或曲美木单抗 (tremelimumab)。

37. 一种用于增强罹患癌症的个体中的由治疗剂引发的抗肿瘤免疫反应的方法，其包含向所述个体施用治疗有效量的如权利要求1至23中任一项的单克隆抗体或其抗原结合部分、如权利要求24的免疫偶联物、如权利要求25的双特异性分子或如权利要求26的药物组合物，使得所述个体经历比由单独的所述治疗剂所引发的免疫反应更强的针对所述癌症的免疫反应。

38. 如权利要求37的方法，其中所述治疗剂为免疫检查点抑制剂或放射疗法，任选其中所述检查点抑制剂为抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4抗体。

39. 一种用于治疗罹患癌症的个体的试剂盒,所述试剂盒包含:

(a) 在约0.01至约20毫克/公斤体重范围内的一或多个剂量的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述单克隆抗体或其抗原结合部分特异性结合C-C基序趋化因子受体8 (CCR8) 且通过ADCC介导表达CCR8的细胞的消耗;

(b) 任选地,在约200至约1600mg范围内的一或多个剂量的特异性结合PD-1、PD-L1或CTLA-4的单克隆抗体或其抗原结合部分;及

(c) 在如权利要求31至36中任一项的方法中使用所述特异性结合CCR8的单克隆抗体或其部分,以及任选地所述特异性结合PD-1、PD-L1或CTLA-4的单克隆抗体或其部分的说明。

抗CCR8抗体用于治疗癌症

[0001] 在整个本申请中,各种公开以括号提及作者名称及日期,或提及专利号或专利公开号。可在说明书的结尾处,在权利要求之前找到这些公开的完全引用。这些公开的公开内容在此以全文引用的方式并入本申请中,以更全面地描述截至本文中所描述及主张的本发明为止,如本领域技术人员已知的目前先进技术。然而,仅在由参考文献并入的信息与由本申请中的明确公开内容提供的信息之间不存在冲突的情况下将这些公开并入本申请中。此外,本文中的参考文献的引用不应视为承认此类参考文献为本发明的先前技术。

[0002] 相关申请的交叉参考

本申请主张以下美国临时申请的权利:2021年3月5日提交的第63/157,618号;2020年6月2日提交的第63/041,992号;及2020年3月23日提交的第62/993,570号,其各自的内容在此以全文引用的方式并入本文中。

序列表

本发明含有序列表,其以ASCII格式电子提交,并在此通过引用方式以其整体并入本文。ASCII拷贝创建于2021年3月19日,命名为20210319_SEQ1_13358WOPCT.txt,其大小81,920字节。

技术领域

[0003] 本发明涉及特异性结合C-C基序趋化因子受体8 (CCR8) 的经分离的抗体 (Ab), 例如单克隆抗体 (mAb), 及用于治疗个体中的癌症的方法,其包含以单药疗法或与诸如免疫检查点抑制剂的抗癌剂的组合形式向个体施用抗CCR8 Ab。

背景技术

[0004] 人类癌症具有许多遗传及表观遗传改变,产生潜在地可由免疫系统识别的新抗原 (Chakravarthi等人,2016)。利用适应性免疫系统的属性来治疗癌症使得免疫疗法因其对许多癌症的适用性及诱导持久的抗肿瘤作用而在所有癌症治疗模式中具有独特性。

[0005] 在通过使用检查点抑制剂 (诸如抗PD-1 Ab、纳武单抗 (nivolumab) (OPDIVO®) 及抗CTLA-4 Ab、伊匹单抗 (ipilimumab) (YERVOY®)) 刺激细胞毒性T细胞的活性来治疗不同实体肿瘤及血液系统肿瘤方面已取得显著成功。然而,在受此治疗影响的癌症中,通常小于约15%的患者从使用检查点抑制剂进行的治疗中长期受益 (Haslam及Prasad,2019),且已证实检查点抑制剂在某些癌症中不太有效,包括乳腺及前列腺癌。免疫抑制机制,尤其由调节性T细胞 (Treg) 介导的免疫抑制机制的持久性可促进所观测到的某些癌症或某些患者对用检查点抑制剂进行的治疗的抗性 (Fares等人,2019;Han等人,2019)。作为一种用于克服此抗性的手段,本申请公开了用于通过降低Treg的免疫抑制作用来刺激免疫系统的方法。

[0006] 肿瘤浸润性CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg,CD4⁺ T细胞的子集,是免疫自体耐受性的介质。与Treg发育及功能相关的基因的缺陷可在小鼠 (Fontenot等人,2003;Khattari等人,2003;Tivol等人,1995) 及人类 (Yagi等人,2004;Kuehn等人,2014) 中引起系统性自身免疫,揭示了Treg在保持免疫稳态中的重要的非冗余性作用。Treg经由多种机制来抑制免疫系

统,包括下调效应T细胞的诱导及增殖、趋化因子及抑制性细胞因子的分泌,以及树突状细胞成熟及功能的抑制(Shitara及Nishikawa,2018;Han等人,2019)。可在肿瘤微环境中引入被Treg用于促进自体耐受性的机制,以抑制抗肿瘤免疫反应。实际上,小鼠中的Treg的全身性消耗足以实现免疫介导的肿瘤消退(Teng等人,2010)。因此,认为Treg在介导对自体抗原的外周耐受性、预防自身免疫疾病及抑制抗肿瘤免疫反应中起作用。

[0007] 因此,已确定降低肿瘤浸润性Treg的活性或数目是有吸引力的逆转肿瘤微环境中的免疫抑制活性及增强抗肿瘤免疫性的方法(Finotello及Trajanoski,2017;Han等人,2019)。在癌症免疫疗法中已经且正在实行各种方法以靶向Treg,包括使用针对表达于Treg上的抗原(诸如CD25(Arce Vargus等人,2017)、CCR4(Ishida等人,2012;Hagemann等人,2014)及CTLA-4(Korman等人,2017))的抗体(Ab)进行的ADCC介导的Treg消耗,及抑制E3泛蛋白连接酶Siah2(Scortegagna等人,2020)及Yes相关蛋白质(YAP;Ni等人,2018)。然而,特异性靶向或消耗来自肿瘤微环境的Treg的临床尝试并不成功。与IL-2融合的白喉毒素(Diphtheria toxin)(地尼白介素denileukin diftitox)未能有效地降低黑素瘤患者中的Treg数目(Luke等人,(2016)),且尽管在小鼠肿瘤模型中显示抗CTLA-4介导的Treg消耗(Selby等人,2013;Simpson等人,2013),但尚不清楚在人类癌症中由伊匹单抗或曲美单抗(tremelimumab)(抗人CTLA-4 Ab)引起的Treg消耗的明确证据(Sharma等人,2019a;Sharma等人,2019b)。通过未经岩藻糖基化(nf)的抗CCR4 Ab莫格利珠单抗(mogamulizumab)实现Treg消耗,但亦观测到常规(conventional)CD4⁺ T细胞的显著消耗及CD8⁺ T细胞数目的中度降低(Kurose等人,2015),从而限制其治疗实体肿瘤方面的效用。因此,仍需要安全且有效的Treg消耗剂,其也避开T效应细胞(Teff)以实现最佳抗肿瘤反应。

[0008] CCR8为一种趋化因子受体,其最近被鉴定为肿瘤浸润性Treg的潜在特异性标志物,因为在多种癌症(包括乳腺、结肠直肠及肺)中,这些Treg中的CCR8表达选择性地地上调(Plitas等人,2016;De Simone等人,2016;Wang等人,2019),且作为IRF4依赖性『效应子』Treg基因计划的核心成员(Alvisi等人,2020)。这些CCR8⁺ Treg表示Treg的高度活化及抑制性亚群,且这些肿瘤类型中的CCR8⁺ Treg的高丰度与不良预后相关联(Wang等人,2019;De Simone等人,2016)。因此,CCR8可为有前景的用于实现肿瘤驻留Treg的消耗以提高抗肿瘤免疫性的治疗目标。靶向CCR8,同时消耗抑制性Treg,亦可具有不消耗驱动抗肿瘤免疫反应的细胞溶解效应细胞(cytolytic effector cells)的优点。此外,因为CCR8极少在外周血液或其他组织中的Treg及Teff上表达,因此靶向CCR8⁺肿瘤Treg可产生最小的毒性风险。

[0009] CCR8为主要表达于瘤内FOXP3^{hi} Treg上的七次跨膜G蛋白质偶联趋化因子受体(GPCR)(Wang等人,2019;Plitas等人,2016;De Simone等人,2016)。CCR8的N端及ECL2区域对于结合其功能性配体C-C基序趋化因子配体1(CCL1)而言是重要的,该配体是由瘤内骨髓细胞及T细胞产生的。除影响Treg迁移至肿瘤微环境(TME)以外,CCL1:CCR8相互作用亦经由CCR8、FOXP3、IL-10及其他抑制因子的上调而增强Treg的免疫抑制能力(Vila-Caballer等人,2019)。

[0010] 最近颁布的美国专利第10,087,259号主张一种通过向癌症患者施用Ab药剂治疗癌症的方法,所述药剂特异性结合CCR8,使得以比正常组织浸润性T细胞更大的程度来特异性消耗患者中的肿瘤浸润性Treg细胞。然而,此专利未举例说明任何特异性结合CCR8的Ab

药剂,也未说明任何通过向个体施用抗CCR8 Ab来治疗任何癌症的方法。

[0011] 美国专利第10,550,191号主张一种用于治疗癌症的方法,其包含施用针对CCR8的Ab。实施例表明单一Ab,可商购的大鼠IgG2b抗小鼠CCR8 (抗mCCR8) Ab (克隆SA214G2; BioLegend, San Diego, CA),降低小鼠肿瘤模型中的各种肿瘤的体积。未公开抗人CCR8 (抗hCCR8) Ab或任何适用于人类疗法的嵌合、人源化或人Ab。

[0012] PCT公开号W0 2018/112033涉及通过向个体施用药剂来治疗癌症的方法,该药剂诱导表达表1或2中所包括的指定基因产物的肿瘤浸润性Treg细胞中的细胞毒性且藉此降低个体中的肿瘤浸润性Treg细胞的数目或活性。CCR8并非表1或2中所包括的基因产物,但实施例8表明抗mCCR8 Ab在小鼠MC38结肠腺癌模型中的中等水平的抗肿瘤活性。

[0013] PCT公开号W0 2019/157098涉及包含重组李斯特菌株(recombinant *Listeria* strain)及抗CCR8 Ab的免疫原性组合物,及用于治疗个体中的肿瘤的方法,该方法包含向个体施用此免疫原性组合物。与美国专利第10,550,191号类似,W0 2019/157098未报告产生任何抗CCR8 Ab,而是说明市售SA214G2抗mCCR8 Ab与基于李斯特菌(*Listeria*)的免疫疗法的组合用于治疗小鼠模型中的移植性结肠癌肿瘤的用途。

[0014] 最近,许多团队报道用于消耗肿瘤相关Treg及治疗癌症的人源化抗CCR8 Ab的产生(参见例如Depis等人,2020;W0 2020/138489;Harbour BioMed,2020)。

[0015] 本文中所公开的本发明表明CCR8的表达高度限于来自不同肿瘤类型的肿瘤Treg。本发明包含抗CCR8 Ab,尤其抗CCR8 mAb,包括人、人源化及嵌合抗hCCR8 mAb的产生,且证明小鼠肿瘤模型中的抗CCR8介导的Treg消耗需要Fc接合(engagement)。本发明还描述在离体人类肿瘤培养物系统中介导肿瘤特异性Treg消耗的nf抗hCCR8 Ab的研发。以单药疗法或与检查点阻断(举例而言,PD-1/PD-L1信号传导路径的抑制)的组合形式的抗CCR8 Ab治疗诱导强效抗肿瘤反应且可向对抗PD-1单药疗法不起反应的患者提供临床效益。抗CCR8介导的Treg消耗与检查点阻断的作用机制的组合提供增加肿瘤细胞的杀伤且藉此治疗广泛范围的癌症的独特机会。

发明概述

[0016] 本发明提供分离的Ab,优选mAb,其特异性结合表达于细胞表面上的CCR8,诸如人CCR8 (hCCR8) 且呈现各种功能特性,包括治疗性Ab所需的特性。这些特性包括以高亲和力结合表达CCR8的细胞,诸如肿瘤浸润性、经活化的CD4⁺FOXP3^{high} Treg;除Treg以外,仅结合胸腺的髓质及皮肤的真皮中的极少且分散的免疫细胞,但不结合许多其他组织;介导通过ADCC进行的表达CCR8的细胞(诸如肿瘤浸润性、经活化的CD4⁺FOXP3^{high} Treg)的消耗(depletion);特异性介导肿瘤浸润性Treg,但非正常组织中的CCR8⁺ T细胞的消耗;抑制CCL1与CCR8的结合且抑制CCR8/CCL1信号传导;在存在或不存在交联Ab的情况下,当与细胞表面上的CCR8结合时,不引起CCR8的内化;在体外(in vitro)和在人肿瘤离体组织样品中介导CCR8⁺ Treg的特异性消耗;及在以单药疗法或与另一种抗癌剂的组合形式向个体施用,抑制个体,优选人类个体中的肿瘤细胞的生长。在优选的实施方案中,抗CCR8 Ab是包含经修饰的重链恒定区(诸如低岩藻糖基化(hypofucosylated)或未经岩藻糖基化(nonfucosylated,nf)的重链恒定区)的经修饰的mAb,其与未经修饰的mAb相比以较高亲和力结合Fc γ 受体(Fc γ R)且介导增强的ADCC。

[0017] 特定地,本发明提供分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其特异性结合表达于

细胞表面上的CCR8且介导通过ADCC进行的表达CCR8的细胞的消耗。在某些实施方案中,CCR8为具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的hCCR8。在某些其他实施方案中,Ab,例如mAb,或其抗原结合部分包含属于人IgG1或IgG3同型的重链恒定区。

[0018] 本发明还提供包含经修饰的重链恒定区的经修饰的抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分,其与未经修饰的mAb或其抗原结合部分相比以较高亲和力结合Fc γ 受体(Fc γ R)且介导增强的ADCC。在优选的实施方案中,经修饰的mAb或其抗原结合部分包含经修饰的IgG1重链恒定区,其呈现减少的岩藻糖基化。在某些实施方案中,mAb或其抗原结合部分结合hCCR8的N端肽,其中表位包含具有序列Y₁₅Y₁₆Y₁₇P₁₈D₁₉I₂₀F₂₁(SEQ ID NO:2)的肽内的至少一个氨基酸且进一步包含硫酸化(sulfated) tyr-15和/或硫酸化tyr-17残基。在某些优选的实施方案中,mAb或其抗原结合部分结合hCCR8的N端肽,其中表位包含具有序列V₁₂T₁₃D₁₄Y₁₅Y₁₆Y₁₇P₁₈D₁₉I₂₀F₂₁S₂₂(SEQ ID NO:109)的肽内的至少一个氨基酸且进一步包含硫酸化tyr-15及硫酸化tyr-17残基。

[0019] 在某些实施方案中,抗CCR8 mAb或其抗原结合部分呈现以下特性中的至少一种,例如至少2、3、4、5、6、7种或全部:(a)以约1nM或更低的EC₅₀或约2nM或更低的EC₅₀特异性结合表达于细胞表面上的CCR8;(b)结合胸腺的髓质及皮肤的真皮中的极少且分散的免疫细胞,但不结合人类大脑、小脑、心脏、肝脏、肺、肾脏、扁桃体、脾、胸腺、结肠、胃、胰腺、肾上腺、垂体、皮肤、外周神经、睾丸或子宫组织或外周血单个核细胞(PBMC);(c)以约5nM或更低的IC₅₀抑制CCL1与CCR8的结合及抑制CCR8/CCL1信号传导;(d)当结合细胞表面上的CCR8时,以约10pM或更低的EC₅₀或以约60pM或更低的EC₅₀介导细胞消耗;(e)当施用于个体时,介导肿瘤浸润性Treg的消耗,但实质上避开脾、血液、皮肤或胸腺中的CCR8⁺ T细胞;(f)在存在或不存在交联Ab的情况下,当结合细胞表面上的CCR8时,不引起CCR8的内化;(g)当以单药疗法形式施用于个体时,抑制个体中的肿瘤细胞的生长;及(h)当与用于治疗癌症的其他治疗剂(诸如免疫检查点抑制剂)组合施用于个体时,抑制个体中的肿瘤细胞的生长。

[0020] 特定地,在某些优选的实施方案中,抗CCR8 mAb或其抗原结合部分至少呈现以下特性:(a)以约1nM或更低的EC₅₀或约2nM或更低的EC₅₀特异性结合表达于细胞表面上的CCR8;(b)以约5nM或更低的IC₅₀抑制CCL1与CCR8的结合及抑制CCR8/CCL1信号传导;(c)当结合细胞表面上的CCR8时,以约10pM或更低的EC₅₀或约60pM或更低的EC₅₀介导细胞消耗;(d)当施用于个体时,介导肿瘤浸润性Treg的消耗,但实质上避开脾、血液、皮肤或胸腺中的CCR8⁺ T细胞;(e)当以单药疗法形式施用于个体时,抑制个体中的肿瘤细胞的生长;及(f)当与用于治疗癌症的其他治疗剂(诸如免疫检查点抑制剂)组合施用于个体时,抑制个体中的肿瘤细胞的生长。

[0021] 在其他实施方案中,抗CCR8 mAb或其抗原结合部分至少呈现以下特性:(a)以约1nM或更低的EC₅₀或约2nM或更低的EC₅₀特异性结合表达于细胞表面上的CCR8;(b)当结合细胞表面上的CCR8时,以约10pM或更低的EC₅₀或约60pM或更低的EC₅₀介导细胞消耗;(c)当施用于个体时,介导肿瘤浸润性Treg的消耗,但实质上避开脾、血液、皮肤或胸腺中的CCR8⁺ T细胞;及(d)当与用于治疗癌症的其他治疗剂(诸如免疫检查点抑制剂)组合施用于个体时,抑制个体中的肿瘤细胞的生长。

[0022] 已详细检验本发明的某些Ab的这些特性,包括例如本文中称为14S15及4A19的Ab。MAb 4A19为nf人源化Ab,而mAb 14S15为nf嵌合Ab,其包含移植至人Fc区上的小鼠Fab片段,

且用包括14S15及4A19的mAb进行本文中所描述的若干测定法。接着,通过修饰框架序列以对应于最类似的人类胚系序列来将14S15 mAb人源化,以产生称为14S15h的Ab(参见实施例10)。在重链可变域的亲和力成熟之后产生的最终迭代人源化mAb呈现与此Ab的原始小鼠或嵌合版本类似且实际上略微更高的对hCCR8的结合亲和力(14S15h Fab片段的 K_D 为0.64nM对比起始小鼠mAb为1.4nM)。因此,预期14S15h将呈现与关于嵌合14S15 mAb所证明相同或极类似的功能特性。因此,上述功能特性(单独或呈组合形式)可与mAb 14S15、14S15h及4A19的结构特征组合存在。

[0023] 举例而言,在本发明的某些实施方案中,Ab或其抗原结合部分可包含以上特性中的一者或多者(例如,以上特性中的至少2、3、4、5或6种)且包含以下中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3结构域:包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸的 V_H ,及包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸的 V_L 。作为另一实例,此类Ab或其抗原结合部分可包含如由Kabat方法定义的以下CDR结构域: V_H CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:33所示序列的连续连接的氨基酸; V_H CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:34所示序列的连续连接的氨基酸; V_H CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:35所示序列的连续连接的氨基酸; V_L CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:36所示序列的连续连接的氨基酸; V_L CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:37所示序列的连续连接的氨基酸;及 V_L CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:38所示序列的连续连接的氨基酸。作为另一实例,此类Ab或其抗原结合部分可包含 V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸。作为另一实例,此类Ab可包含重链,所述重链包含具有如SEQ ID NO:100所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,所述轻链包含具有如SEQ ID NO:112所示序列的连续连接的氨基酸。任选地,Ab的重链具有降低的岩藻糖基化作用,或具有低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的重链恒定区,如本文中其他地方所描述。

[0024] 举例而言,在本发明的某些其他实施方案中,Ab或其抗原结合部分可包含以上特性中的一者或多者(例如,以上特性中的至少2、3、4、5或6种)且包含以下中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3结构域:包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸的 V_H ,及包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸的 V_L 。作为另一实例,此类Ab或其抗原结合部分可包含如由Kabat方法定义的以下CDR结构域: V_H CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:103所示序列的连续连接的氨基酸; V_H CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:104所示序列的连续连接的氨基酸; V_H CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:105所示序列的连续连接的氨基酸; V_L CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:106所示序列的连续连接的氨基酸; V_L CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:107所示序列的连续连接的氨基酸;及 V_L CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:108所示序列的连续连接的氨基酸。作为另一实例,此类Ab或其抗原结合部分可包含 V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸。作为另一实例,此类Ab可包含重链,其包含具有如SEQ ID NO:117所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:118所示序列的连续连接的氨基酸。任选地,Ab的重链具有降低的岩藻糖基化作用,或具有低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的重链恒定区,如本文中其他地方所描述。

[0025] 举例而言,在本发明的某些其他实施方案中,Ab或其抗原结合部分可包含以上特性中的一者或多者(例如,以上特性中的至少2、3、4、5或6种)且包含以下中的每一者中的

CDR1、CDR2及CDR3结构域：包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸的 V_H ，及包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸的 V_L 。作为另一实例，此类Ab或其抗原结合部分可包含如由Kabat方法定义的以下CDR结构域： V_H CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:45所示序列的连续连接的氨基酸； V_H CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:46所示序列的连续连接的氨基酸； V_H CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:47所示序列的连续连接的氨基酸； V_L CDR1，其包含具有如SEQ ID NO:48所示序列的连续连接的氨基酸； V_L CDR2，其包含具有如SEQ ID NO:49所示序列的连续连接的氨基酸；及 V_L CDR3，其包含具有如SEQ ID NO:50所示序列的连续连接的氨基酸。作为另一实例，此类Ab或其抗原结合部分可包含 V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。作为另一实例，此类Ab可包含重链，其包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸，及轻链，其包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸。任选地，Ab的重链具有降低的岩藻糖基化作用，或具有低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的重链恒定区，如本文中其他地方所描述。

[0026] 本发明还提供分离的Ab，优选mAb，或其抗原结合部分，其特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8且包含以下重链及轻链可变区对中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3结构域：

(a) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:3所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:15所示序列的连续连接的氨基酸；

(b) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸；

(c) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:5所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:17所示序列的连续连接的氨基酸；

(d) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸；

(e) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:7所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:19所示序列的连续连接的氨基酸；

(f) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:8所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:20所示序列的连续连接的氨基酸；

(g) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:21所示序列的连续连接的氨基酸；

(h) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:10所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:22所示序列的连续连接的氨基酸；

(i) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:11所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:23所示序列的连续连接的氨基酸；

(j) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:12所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:24所示序列的连续连接的氨基酸；

(k) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:13所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:25所示序列的连续连接的氨基酸；

(l) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:14所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:26所示序列的连续连接的氨基酸；或

(m) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸。

[0027] 特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8且包含以下重链及轻链可变区对中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3结构域的分离的Ab, 优选mAb, 或其抗原结合部分为特定实例:

(a) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸; 及

(c) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。

[0028] 特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8且包含以下重链及轻链可变区对中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3结构域的分离的Ab, 优选mAb, 或其抗原结合部分为特定实例:

(a) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。

[0029] CDR的序列可由各种方法定义, 包括Kabat、Chothia、AbM、接触式(contact) 及IMGT定义。除非另有明确说明, 否则在本发明中通过Kabat定义来鉴定CDR。

[0030] 本公开还提供编码本文中所描述的抗CCR8 mAb中的任一者或其抗原结合部分的经分离的核酸。本发明提供包含该经分离的核酸的表达载体, 及包含该表达载体的宿主细胞。此宿主细胞可用于制备抗CCR8 mAb或其抗原结合部分的方法中, 所述方法包含在该宿主细胞中表达mAb或其抗原结合部分及自宿主细胞分离mAb或其抗原结合部分。

[0031] 在某些实施方案中, 本发明提供一种用于治疗罹患癌症的个体的方法, 其包含向个体施用例如介导表达CCR8的细胞的消耗的治疗有效量的本文中所描述的抗CCR8 mAb或其抗原结合部分, 使得个体得到治疗。在其他实施方案中, 本发明提供一种用于抑制个体中的肿瘤细胞的生长的方法, 其包含向个体施用例如介导表达CCR8的细胞的消耗的治疗有效量的本文中所描述的抗CCR8 mAb或抗原结合部分, 使得抑制个体中的肿瘤细胞的生长。在这些方法的某些实施方案中, 当结合细胞表面上的CCR8时, 抗CCR8 mAb以约10pM或更低的 EC_{50} 介导细胞的消耗。在某些其他实施方案中, 当结合细胞表面上的CCR8时, 抗CCR8 mAb以约5nM或更低的 IC_{50} 抑制CCL1与CCR8的结合且抑制CCR8/CCL1信号传导。在其他实施方案中, 本发明提供例如介导表达CCR8的细胞的消耗的本文中所描述的抗CCR8 mAb或其抗原结合部分, 其系用于治疗罹患癌症的个体的方法中或用于抑制个体中的肿瘤细胞的生长的方法中, 各方法包含向个体施用治疗有效量的抗CCR8 mAb或其抗原结合部分。

[0032] 本发明还提供用于治疗罹患癌症的个体的方法, 其包含向个体施用治疗有效量的以下的组合: (a) 抗CCR8 Ab, 例如本文中所描述的mAb或其抗原结合部分, 其例如介导表达CCR8的细胞的消耗, 及 (b) 其他用于治疗癌症的治疗剂, 任选其中该其他治疗剂为降低免疫系统的抑制或增加免疫系统的刺激的化合物。在某些优选的实施方案中, 该其他治疗剂为拮抗性Ab或其抗原结合部分, 其特异性结合PD-1、PD-L1或CTLA-4。该方法亦可为用于抑制个体中的肿瘤细胞的生长的方法。

[0033] 当此类方法涉及使用治疗剂的组合时, 其可以不同方式提及。举例而言, 当治疗方法使用药剂(A) 及(B) 时, 例如用于治疗癌症, 此可称为: (i) 用于治疗癌症的方法的药剂(A)

及药剂(B);(ii)在用于治疗癌症的方法中与药剂(B)一起使用的药剂(A);或(iii)在用于治疗癌症的方法中与药剂(A)一起使用的药剂(B)。因此,以上组合可被称为:

(i)(A)抗CCR8 mAb或其抗原结合部分,例如,其介导表达CCR8的细胞的消耗,及(B)其他用于治疗癌症的治疗剂,用于治疗罹患癌症的个体的方法中或用于抑制个体中的肿瘤细胞的生长的方法中,该方法包含向个体施用治疗有效量的以下的组合:(A)抗CCR8 mAb或其抗原结合部分,例如其介导表达CCR8的细胞的消耗,及(B)其他用于治疗癌症的治疗剂;或

(ii)(A)抗CCR8 mAb或其抗原结合部分,例如,其介导表达CCR8的细胞的消耗,与(B)其他治疗剂一起用于治疗癌症,用于治疗罹患癌症的个体的方法中或用于抑制个体中的肿瘤细胞的生长的方法中,该方法包含向个体施用治疗有效量的以下的组合:(A)抗CCR8 mAb或其抗原结合部分,例如其介导表达CCR8的细胞的消耗,及(B)其他用于治疗癌症的治疗剂;或

(iii)(B)其他用于治疗癌症的治疗剂,其与(A)例如介导表达CCR8的细胞的消耗的抗CCR8 mAb或其抗原结合部分一起使用,用于治疗罹患癌症的个体的方法中或用于抑制个体中的肿瘤细胞的生长的方法中,该方法包含向个体施用治疗有效量的以下的组合:(B)其他用于治疗癌症的治疗剂,及(A)例如介导表达CCR8的细胞的消耗的抗CCR8 mAb或其抗原结合部分。

[0034] 本发明还提供一种试剂盒,其包含:(a)在约0.01至约20毫克/公斤体重的范围的一或多种剂量或约0.1至约2,000mg固定剂量的分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其特异性结合表达于细胞表面上的CCR8且介导通过ADCC进行的表达CCR8的细胞的消耗;(b)任选地,在约200至约1600mg的范围内的一或多种剂量的mAb或其抗原结合部分,其特异性结合PD-1、PD-L1或CTLA-4;及(c)在本文中所公开的治疗方法中使用特异性结合CCR8的分离的Ab或其部分及任选地,特异性结合PD-1、PD-L1或CTLA-4的mAb或其部分的说明。

[0035] 本发明的其他特征及优点将自以下详细说明及实施例显而易见,该等详细说明及实施例不应视为限制性的。所引用的所有参考文献(包括在本申请通篇中所引用的科学文章、GenBank项、专利及专利申请)的内容皆明确地以引用的方式并入本文中。

附图说明

[0036] 图1A-1C展示癌症基因体图谱(Cancer Genome Atlas;TCGA)中的人CCR8及FOXP3基因-基因相关性的分析。A:跨越所有非血基质TCGA肿瘤RNA-seq的基因-基因相关性的基于相互等级的网状图将CCR8鉴定为Treg选择性标志物。B:肝细胞癌(HCC)单个细胞RNA-seq的分析表明CCR8选择性表达于HCC肿瘤样品中的FOXP3^{high}淋巴细胞上。C:在FOXP3⁺ T淋巴细胞中进行的斯皮尔曼相关性分析(Spearman correlation analysis)表明CCR8表达与较高的FOXP3表达量相关联。

图2A-2F展示与其他Treg靶向分子相比,CCR8表达在肿瘤Treg上富集。A:来自癌症患者(结肠直肠、肾脏、肺及黑素瘤)的肿瘤及血液的Treg中的CCR8、CCR4、CTLA-4及CD25阳性率的流式细胞术分析(n=8-18)。B:来自癌症患者的血液(n=6-10)及肿瘤(n=7-20)的CD4⁺FOXP3⁺ Treg上的Treg目标的相对表达量(MFI)。C-E:来自肿瘤(C)及血液(D)的CD4⁺ Tconv以及来自癌症患者的肿瘤(E)(n=7-17)及外周血液样品(F)(n=5-13)的CD8⁺ T细胞

上的Treg目标出现率。未分析所有患者的所有标志物且并非所有患者皆具有相匹配的血液样品。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ 。A-B: 双因子ANOVA, 接着进行庞费洛尼多重比较测试 (Bonferroni's multiple comparisons test); C-F: 单因子ANOVA 克拉斯卡-瓦立斯测试 (Oneway ANOVA Kruskal-Wallis test), 接着进行邓恩多重比较 (Dunn's multiple comparisons)。

图3A-3C展示流式细胞术分析, 其说明CCR8大量表达于肿瘤浸润性Treg上。在不同T细胞群体中测量CCR8的表达量。A: 表达CCR8的肿瘤浸润性T淋巴细细胞子集的百分比。与常规 $CD4^+FOXP3^-$ ($CD4^+ T_{conv}$) T细胞及 $CD8^+$ T细胞 ($CD8$) 相比, 肿瘤浸润性Treg以显著更高的频率表达CCR8。B: 结合肿瘤浸润性T淋巴细细胞子集的PE结合的抗CCR8 Ab的平均荧光强度 (MFI)。与 $CD4^+ T_{conv}$ 及 $CD8$ 细胞相比, 以每个细胞计, 肿瘤Treg亦表达更大量的CCR8。C: 癌症患者的血液及肿瘤组织中的 $CCR8^+$ Treg上的Treg CCR8表达量的比较。与肿瘤浸润性Treg上的显著更高的量相比, 外周血液中的Treg上的CCR8表达量较低。

图4A-4D展示CCR8在不同Treg亚群上差异性表达。A: 来自健康个体的PBMC中的不同T细胞群体内的表达CCR8的细胞的百分比。CCR8大量表达于外周Treg上。B: 健康个体中的不同Treg亚群内的表达CCR8的细胞的百分比。在Treg群体内, CCR8在效应子记忆群体 (EM) 中较大量地表达且在中心记忆细胞 (CM) 中以较低程度表达, 且极少量的CCR8在原生Treg中表达。C: 常规 $CD4^+ T_{conv}$ 细胞内的表达CCR8的细胞的百分比。这些 $CD4^+ T_{conv}$ 细胞的任何亚群中存在极少的CCR8表达。D: 结合来自外周血液的 $CCR8^+$ Treg或来自癌症患者的肿瘤浸润性Treg的抗CCR8 Ab的平均荧光强度 (MFI)。在癌症患者中, 以每个细胞计, 与来自外周血液的Treg相比, 肿瘤浸润性Treg上存在更高的CCR8表达。

图5展示CCR8表达于免疫抑制性最高的 $CD4^+FOXP3^{high}$ Treg群体上。将来自2名黑色素瘤患者及1名肾细胞癌 (RCC) 患者的肿瘤针对FOXP3及CCR8表达进行解离及染色。CCR8主要由代表活化程度最高的Treg的 $CD4^+FOXP3^{high}$ 群体表达。

图6A-6D展示表达CD25、CD39及IL1R2的 $CCR8^+$ 及 $CCR8^-$ T细胞的百分比。A: 表达CD25的 $CCR8^+$ 及 $CCR8^-$ 细胞的百分比; B: 表达CD39的 $CCR8^+$ 及 $CCR8^-$ 细胞的百分比; C: 表达IL1R2的 $CCR8^+$ 及 $CCR8^-$ 细胞的百分比; D: 表达IL1R2的经刺激的 $CCR8^+$ 及 $CCR8^-$ 细胞的百分比。

图7A-7D展示表达CD25、CD39及IL1R2的 $CCR4^+$ 及 $CCR4^-$ T细胞的百分比。A: 表达CD25的 $CCR4^+$ 及 $CCR4^-$ 细胞的百分比; B: 表达CD39的 $CCR4^+$ 及 $CCR4^-$ 细胞的百分比; C: 表达IL1R2的 $CCR4^+$ 及 $CCR4^-$ 细胞的百分比; D: 表达IL1R2的 $CCR4^+$ 及 $CCR4^-$ 细胞的百分比。

图8A及8B展示表达活化标志物HLA-DR的 $CCR8^+$ 及 $CCR8^-$ T细胞的百分比 (8A), 及表达此标志物的 $CCR4^+$ 及 $CCR4^-$ T细胞的百分比 (8B)。

图9A-9C展示表达IFN γ 、IL-2及颗粒酶B的经刺激的 $CCR8^+$ 及 $CCR8^-$ T细胞的百分比。A: 表达IFN γ 的经刺激的 $CCR8^+$ 及 $CCR8^-$ 细胞的百分比; B: 表达IL-2的经刺激的 $CCR8^+$ 及 $CCR8^-$ 细胞的百分比; C: 表达颗粒酶B的经刺激的 $CCR8^+$ 及 $CCR8^-$ 细胞的百分比。

图10A-10C展示表达IFN γ 、IL-2及颗粒酶B的经刺激的 $CCR4^+$ 及 $CCR4^-$ T细胞的百分比。A: 表达IFN γ 的经刺激的 $CCR4^+$ 及 $CCR4^-$ 细胞的百分比; B: 表达IL-2的经刺激的 $CCR4^+$ 及 $CCR4^-$ 细胞的百分比; C: 表达颗粒酶B的经刺激的 $CCR4^+$ 及 $CCR4^-$ 细胞的百分比。

图11A及11B展示不同的抗hCCR8 mAb与表达hCCR8的细胞株或经活化的人Treg的结合。A: 产生抗hCCR8 Ab, 其呈现不同范围的对经hCCR8转染的细胞株 (293F、CHO、Raji) 及

经活化的人Treg的结合亲和力(EC_{50} 组,以nM表示)。B:展示结合经活化的Treg的抗CCR8 mAb的所选择的子集的 EC_{50} 值(nM)。

图12A及12B展示结合hCCR8N端肽的4A19 Fab片段的晶体结构。A:以2.03 Å分辨率结合仅经硫酸化(在tyr-17处)的hCCR8N端肽的4A19 Fab片段。由4A19 mAb结合的表位包含残基15-21,其中硫酸化酪氨酸-17残基位于表位的中心;B:以1.80 Å分辨率结合经双硫酸化(在tyr-15及tyr 17处)的hCCR8N端肽的4A19 Fab片段。由4A19 mAb结合的表位包含残基12-22。

图13A及13B展示分别以1μg/ml(上部小图)及3μg/ml(上部小图)施用于正常人类PBMC及正常人类胸腺的不同抗hCCR8 mAb的组织交叉反应性。A:mAb 18Y12(左侧小图)、16B13(中间小图)及4A19(右侧小图)与PBMC的结合。mAb 18Y12及4A19未结合PBMC,而16B13展示与目标的大量结合,该目标不太可能为CCR8。B:mAb 18Y12(左侧小图)、16B13(中间小图)及4A19(右侧小图)与胸腺组织的结合。mAb 18Y12未展示任何染色,而在胸腺的髓质中的稀少及分散的免疫细胞中观测到mAb 4A19的阳性染色。mAb 16B13展示胸腺中的绝大部分免疫细胞中的强烈及弥漫性染色,其中主要为细胞质和/或核周模式。

图14A-14C展示抗hCCR8 mAb阻断人类CCL1(hCCL1)与hCCR8的结合。A:抗hCCR8 mAb呈现不同的阻断经hCCR8转染的CHO细胞上hCCL1与hCCR8的结合的能力,如通过Ca通量的抑制所评估。B:展示7种所选择的抗hCCR8 Ab的CCL1信号传导(CCL1诱导的Ca通量)的阻断百分比。C:展示4种所选择的抗CCR8 mAb的Ca通量阻断 IC_{50} 曲线。

图15A及15B展示抗hCCR8 mAb介导CD16表达报道细胞的CD16交联,其反映抗CCR8 mAb的ADCC潜力。用抗CCR8 Ab(具有未经岩藻糖基化(nf)或野生型hIgG1主链)处理表达CD16的荧光素酶报道细胞与表达CCR8的Raji细胞或经活化的Treg的共同培养物。A:观测到某一范围内的CD16交联能力。B:描绘所选择的具有hIgG1-nf主链的抗hCCR8 mAb的集合的使用经活化的Treg作为目标的CD16交联。

图16展示抗CCR8 Ab通过同种异体NK细胞来介导经活化的Treg的杀伤。将经活化的Treg与经预致敏的同种异体NK细胞及经滴定的抗hCCR8 Ab共同培养。通过Treg上的磷脂结合蛋白-V(Annexin-V)阳性来测量细胞死亡。

图17A及17B展示抗CCR8 mAb在体外通过同种异体NK细胞介导患者肿瘤Treg的杀伤。将以酶促方式解离的患者子宫内膜肿瘤与经预致敏的同种异体NK细胞一起在37℃下共同培养24小时。抗CCR8 Ab,14S15,特异性消耗患者肿瘤Treg(图17A),但不消耗常规 $CD4^+$ T细胞(图17B)。相比之下,抗CCR4 Ab(CCR4)介导Treg及常规 $CD4^+$ T细胞的消耗(图17A及17B)。

图18A-18I展示抗hCCR8-hIgG1-nf Ab在不添加同种异体NK细胞的情况下介导离体患者肿瘤切片培养物系统中的CCR8⁺ Treg消耗。A-C:在在体外用14S15-IgG1-nf或抗hCCR4-IgG1-nf处理后,外周血液Treg(A)、 $CD4^+$ Tconv(B)及 $CD8^+$ T细胞(C)的消耗的代表性结果。D-F:来自比较14S15-IgG1-nf(D)、抗hCCR4-IgG1-nf(E)及同型(F)Ab的非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤及同种异体NK细胞杀伤测定法的代表性曲线。A-F:14S15-IgG1-nf,实心圆;抗hCCR4-IgG1-nf,正方形;同型IgG1-nf,空心圆。G:比较16B13-IgG1-nf与抗hCCR8-惰性及同型对照Ab的同种异体NK及NSCLC肿瘤共同培养。G:同型IgG1-nf,空心圆;14S15-IgG1-nf,实心圆;14S15-IgG1-惰性,三角形。H及I:来自在存在16B13-IgG1-nf或IgG1-nf同型对照的情

况下培养24小时的肾细胞癌(H)及胃癌(I)的离体原发性完整肿瘤切片的结果(对于每种条件,3-5个技术复本)。H及I:同型IgG1-nf,空心圆;14S15-IgG1-nf,实心圆。 $*P<0.05$, $****P<0.0001$ 。普通单因子ANOVA及杜凯氏多重比较测试(Tukey's multiple comparisons test)(G)。曼-惠特尼检定(Mann-Whitney test)(双尾)(G-I)。

图19展示抗CCR8 Ab在存在或不存在交联的情况下不诱导经活化的Treg上的CCR8内化。在存在或不存在抗人Fc交联Ab的情况下,将经活化的Treg与抗CCR8 mAb 4A19、阳性对照Ab(抗ICOS)及同型对照一起培育。在各种时间评估Treg表面上的CCR8表达。

图20A-20D展示当经消化的患者肿瘤与同种异体自然杀伤(NK)细胞在体外共同培养时,由抗CCR8引起的肿瘤Treg的消耗。A:mAb 4A19(CCR8-nf)诱导可测量的患者肿瘤Treg的消耗,大于由未经岩藻糖基化的抗hCCR4 mAb(CCR4-nf)引起的消耗。B:相反,抗CCR4-nf Ab,但非mAb 4A19,诱导CD4⁺ T_{eff}细胞的消耗。C:抗CCR8及抗CCR4皆不消耗CD8⁺ T_{eff}。D:与4A19(CCR8-nf)形成对比,具有无关的靶向臂的对照性抗钥孔血蓝蛋白(KLH)-nf mAb(同型)及具有惰性主链的4A19 mAb(CCR8-惰性)皆不消耗Treg。

图21A-21D展示小鼠模型中的CT26结肠癌的抗CCR8抑制生长。A:用抗CCR8-mIgG2a(具有来源于BioLegend的大鼠抗mCCR8 mAb(克隆SA214G2)的mIgG2a同型的抗mCCR8 Ab)治疗CT26结肠癌可显著减少肿瘤生长及增加无肿瘤小鼠的数目。描绘个别肿瘤体积。B:平均肿瘤体积的变化。C:在抗CCR8治疗情况下观测到肿瘤Treg消耗,而脾Treg的数目不受抗CCR8治疗影响(D)。

图22A-22F展示在患有CT26结肠腺癌的小鼠中,抗CCR8对T淋巴细胞群体的作用,如通过流式细胞术分析。A:脾、血液、肿瘤Treg及皮肤中的表达CD4⁺FOXP3⁺ Treg的CCR8(Treg)、FOXP3-CD4⁺效应细胞(CD4_{eff})及CD8⁺ T(CD8T)细胞的百分比。B:表达双重阴性CD4⁻CD8⁻的CCR8(DN)、单阳性CD4⁺CD8⁻(CD4SP)、单阳性CD4⁻CD8⁺(CD8 SP)及双重阳性CD4⁺CD8⁺(DP)胸腺细胞的百分比。C:在用抗CCR8-mIgG2a mAb及同型对照物治疗后,脾、血液、肿瘤及皮肤中的Foxp3⁺ Treg的百分比。D:在用抗CCR8-mIgG2a及同型对照物治疗后,胸腺中的DP、CD8 SP、CD4SP及DN胸腺细胞的百分比。E:在用抗CCR8-mIgG2a及同型对照物治疗后,皮肤中的CD4⁺ T细胞的百分比。F:在用抗CCR8-mIgG2a及同型对照物治疗后,皮肤中的CD8⁺ T细胞的百分比。

图23A及23B展示抗CCR8抑制小鼠模型中的MC38结肠癌。A:用抗CCR8-mIgG2a治疗MC38结肠癌可显著减少肿瘤生长及增加无肿瘤小鼠的数目。B:平均肿瘤体积的变化。

图24A-24D展示抗mCCR8 Ab诱导的Treg消耗在MC38结肠癌小鼠模型中引起强效单一药剂功效以及增加的药效学及药物动力学反应。A:抗mCCR8 mAb的单次剂量引起肿瘤体积的剂量依赖性降低、Treg(Foxp3⁺CD4⁺百分比)消耗(B)及肿瘤浸润性CD8⁺ T细胞的百分比增加(C)。误差条指示平均值的标准偏差。D:抗mCCR8 mAb在0.03至3mg/kg的剂量范围内显示非线性PK。

图25A-25C展示与单独的抗PD-1或抗CCR8 Ab疗法相比,小鼠抗mPD-1 Ab与小鼠抗mCCR8 Ab的组合对肿瘤生长的作用,如通过MB49鼠类膀胱癌模型中的肿瘤体积的变化所测量。A:抗CCR8-mIgG2a及抗PD-1分别诱导中等及低水平的肿瘤生长抑制,但在组合时显示完全抑制肿瘤生长的协同功效。B:在存在或不存在抗PD-1的情况下,用抗CCR8-mIgG2a进行治疗可显著降低肿瘤Treg出现率,但增加抗肿瘤CD8⁺ T细胞出现率(C)。

图26展示与单独的抗PD-1或抗CCR8 Ab疗法相比,小鼠抗mPD-1 Ab与小鼠抗mCCR8 Ab的组合对肿瘤生长的作用,如通过4T1鼠类乳腺癌模型中的肿瘤体积的变化所测量。抗PD-1未展示抑制肿瘤生长方面的活性,其中肿瘤生长与用阴性对照Ab的组合治疗的小鼠极类似,而抗CCR8-mIgG2a诱导中等水平的肿瘤生长抑制。抗CCR8与抗PD-1以协同方式相互作用,从而几乎完全抑制肿瘤生长。

图27A及27B展示包含惰性Fc恒定区的抗mCCR8 Ab在SAIN纤维肉瘤小鼠模型中呈现抗肿瘤活性。A:抗CCR8-mIgG2a治疗有效地减少肿瘤生长,其中全部9只小鼠在植入后第25天皆不具有肿瘤。用Fc-惰性Ab(抗CCR8-mIgG1-D265A)阻断CCR8可部分减少肿瘤生长。B:由抗CCR8-mIgG2a治疗而非Fc-惰性抗CCR8-mIgG1-D265A实现通过用抗CCR8进行的治疗来消耗肿瘤Treg。

图28A-28F展示在MC38肿瘤模型中,抗mCCR8 Ab活性需要Fc受体接合(engagement)。在200微克/小鼠/治疗的情况下,在肿瘤植入后第7、10及14天,用抗CCR8-mIgG2a(n=10)(B)、抗CCR8-mIgG1-D265A(n=10)(C)或IgG2a同型对照物(n=10)(D)治疗的C57BL/6小鼠中植入的MC38肿瘤的平均值(A)及个别生长曲线。E:在植入后第15天收集MC38肿瘤且通过流式细胞术(n=5只/组)来评估Treg消耗,**P<0.01。单因子ANOVA克拉斯卡-瓦立斯测试及邓恩多重比较。F:在MC38肿瘤植入后第13天,MC38肿瘤及外周组织中的Ccr8^{+/+}及Ccr8^{-/-}供体衍生的Treg的比例。**P<0.01。双因子ANOVA,接着进行庞费洛尼多重比较测试。

图29A-29I展示抗CCR8-mIgG2a在异源再攻击模型中诱导生产性记忆反应。在肿瘤达到100-120mm³后,将植入CT26肿瘤的小鼠随机分组。A-C:在0.2毫克/小鼠/治疗的情况下,在随机分组之后第1、4及8天,用以下处理的CT26肿瘤中的生长曲线及Treg消耗:(A)抗CCR8-mIgG2a(n=8),(B)抗CTLA4-mIgG2a(n=8)或(C)mIgG2a同型对照物(n=8)。在随机分组之后第9天,通过流式细胞术来分析来自各组的六个肿瘤,以评估Treg消耗(D)及AH1-四聚物⁺CD8⁺T细胞的出现率(E)。F:在治疗之后第92天,血液中的AH1-四聚物⁺CD8⁺T细胞的出现率。G:在用LM-AH1A5攻击之后第5天,血液中的AH1-四聚物⁺CD8⁺效应子记忆T细胞(TEM)的出现率。H及I:在用AH1A5肽刺激5小时之后,脾中的(H)IFN γ ⁺及(I)多功能IFN γ ⁺TNF α ⁺CD8⁺T细胞的细胞内细胞因子染色。ns,不显著;*P<0.05,**P<0.01。单因子ANOVA克拉斯卡-瓦立斯测试及邓恩多重比较(D-I)。

图30A及30B展示多种人类癌症中的CCR8的可变表达。在来自两个样品集合(全尺寸组织切片及MTB集合)的17种癌症类型/亚型中进行免疫组织化学(IHC)。A:展示6种肿瘤类型/亚型的福尔马林固定石蜡包埋(formalin-fixed paraffin-embedded;FFPE)载玻片中的CCR8⁺细胞的完全载玻片影像分析的全尺寸组织切片,其中每种肿瘤类型具有14-24个样品。B:展示16种肿瘤类型/亚型的多肿瘤块体(MTB)集合,其中每种肿瘤类型具有20个病例。以每个FFPE块体计,各MTB含有单一适应症的5个病例及作为阳性对照的1个增生性扁桃体样品。

发明详述

[0037] 本发明涉及特异性且以高亲和力结合表达于细胞表面上的CCR8的mAb,及用于治疗个体中的癌症的方法,该方法包含以单药疗法或与诸如免疫检查点抑制剂的抗癌剂、化学治疗剂和/或放射疗法组合的形式向个体施用抗CCR8 Ab。本文中在多种不同的临床前小

鼠肿瘤模型中证明单独的CCR8介导的Treg消耗及其与PD-1阻断的组合在有效抑制肿瘤生长方面的作用。

[0038] 术语

为了使本发明可更易于理解,首先对某些术语进行定义。如本申请中所使用,除非本文中另外明确提供,否则以下术语中的每一者应具有下文阐述的含义。在整个本申请中,阐述其他定义。

[0039] “施用(Administering/administer)”或“给药”是指使用本领域技术人员已知的多种方法及递送系统中的任一者向个体物理引入包含治疗剂的组合物。治疗性Ab(诸如抗CCR8及抗PD-1 Ab)的优选给药途径为静脉内(IV)给药。其他给药途径包括皮下(SC)、腹膜内(IP)、肌肉内(IM)、脊椎或其他肠胃外给药途径,例如通过注射或输注。如本文中所使用,词组“肠胃外给药”意谓除经肠及局部给药以外的给药模式,通常通过注射进行,且包括(但不限于)静脉内、腹膜内、肌肉内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眶内、心内、皮内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛膜下、脊椎内、硬膜外及胸骨内注射及输注,以及活体内电致孔。或者,本发明的Ab可经由非肠胃外途径施用,诸如局部、表皮或黏膜给药途径,例如鼻内、经口、经阴道、经直肠、舌下或局部。给药亦可例如进行一次、复数次和/或经一或多个延长的周期。

[0040] “抗体”(Ab)应包括(但不限于)特异性结合抗原且包含由二硫键互连的至少两个重(H)链及两个轻(L)链的糖蛋白免疫球蛋白(Ig)或其抗原结合部分。各H链包含重链可变区(在本文中缩写为 V_H)及重链恒定区。IgG Ab的重链恒定区包含三个恒定域,即 C_{H1} 、 C_{H2} 及 C_{H3} 。各轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为 V_L)及轻链恒定区。IgG Ab的轻链恒定区包含一个恒定域,即 C_L 。 V_H 及 V_L 区可进一步再分成高变区,称为互补决定区(CDR),穿插有称为框架区(FR)的保守性更高的区域。各 V_H 及 V_L 包含三个CDR及四个FR,其自氨基端至羧基端按以下顺序排列:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。重链及轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。已使用各种方法划定Ab内的CDR结构域,包括Kabat、Chothia、AbM、接触式及IMGT定义。Ab的恒定区可介导Ig与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)及经典补系统的第一组分(C1q)的结合。

[0041] 如本文中所使用且根据常规用法,描述为包含“一个”重链和/或“一个”轻链的Ab系指包含所述重链和/或轻链中的“至少一者”的Ab,且因此将涵盖具有两个或更多个重链和/或轻链的Ab。特定地,如此描述的Ab将涵盖具有两个实质上一致重链及两个实质上一致轻链的常规Ab。若Ab链由于转译后修饰(包括例如赖氨酸残基的C端裂解及替代性糖基化模式)而不同,则其可实质上一致但非完全一致。

[0042] Ig可来源于任何通常已知的同型,包括(但不限于)IgA、分泌性IgA、IgG及IgM。IgG子类亦为本领域技术人员所熟知且包括(但不限于)人IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。“同型”系指由重链恒定区基因编码的Ab类别或子类(例如,IgM、IgG1或IgG4)。作为实例,术语“抗体”包括天然存在及非天然存在的Ab、单克隆及多株Ab、嵌合及人源化Ab、人类或非人Ab、完全合成Ab及单链Ab。非人Ab可通过重组方法来部分或完全人源化,以降低其在人类中的免疫原性。若未明确陈述且除非上下文指示,否则术语“抗体”亦包括前述Ig中的任一者的抗原结合片段或抗原结合部分,且包括单价及二价片段或部分,及单链Ab。

[0043] “经分离的”Ab系指实质上不含其他具有不同抗原特异性的Ab的Ab(例如,特异性

结合CCR8的分离的Ab实质上不含特异性结合除CCR8以外的抗原的Ab,诸如结合CCR4的Ab)。然而,特异性结合人CCR8(hCCR8)的分离的Ab可与其他抗原(诸如来自不同物种(诸如小鼠及食蟹猴(*cynomolgus monkey*))的CCR8多肽)具有交叉反应性。此外,在某些情况下,分离的Ab亦可意谓经纯化以实质上不含其他细胞材料和/或化学物质的Ab。作为比较,“分离的”核酸系指物质的核酸组合物,其与天然存在的核酸明显不同,亦即,具有独特的化学一致性、性质及效用。举例而言,与原生DNA不同,经分离的DNA为原生DNA的独立部分且不为在自然界中发现的较大的结构性复合物(染色体)的整体部分。此外,与原生DNA不同,经分离的DNA可用作PCR引子或杂交探针,以尤其用于测量基因表达及侦测生物标志物基因或突变,以用于诊断疾病或预测治疗剂的功效。此外,在某些情况下,经分离的核酸可意谓使用本领域熟知的标准技术纯化,以实质上不含其他细胞组分或其他污染物(例如,其他细胞核酸或蛋白质)的核酸。

[0044] 术语“单克隆”Ab(mAb)系指具有单一分子组成的Ab分子的非天然存在的制剂,亦即,一级序列实质上一致且对特定表位呈现单一结合特异性及亲和力的Ab分子。mAb为分离的Ab的实例。mAb可通过杂交瘤、重组、转基因或本领域技术人员已知的其他技术产生。

[0045] “嵌合”Ab系指其中可变区来源于一个物种且恒定区来源于另一物种的Ab,诸如其中可变区来源于小鼠Ab且恒定区来源于人Ab的Ab。

[0046] “人”mAb(HuMAb)系指具有可变区的mAb,其中框架及CDR区皆来源于人胚系免疫球蛋白序列。此外,若Ab含有恒定区,则恒定区亦来源于人胚系免疫球蛋白序列。本发明的人Ab可包括不由人胚系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过在体外随机或定点突变诱发或通过活体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文中所使用,术语“人”Ab不意图包括其中来源于另一种哺乳动物物种(诸如小鼠)的胚系的CDR序列已移植至人框架序列上的Ab。术语“人”Ab及“完全人”Ab系同义地使用。

[0047] “人源化”mAb系指其中非人类mAb的CDR结构域外的一些、大部分或所有氨基酸由来源于人类免疫球蛋白的相应氨基酸置换的mAb。在Ab的人源化形式的一个实施方案中,CDR结构域外的一些、大部分或所有氨基酸已由来自人类免疫球蛋白的氨基酸置换,而一或多个CDR区内的一些、大部分或所有氨基酸未改变。容许氨基酸的小型添加、缺失、插入、取代或修饰,只要其不消除Ab结合特定抗原的能力即可。“人源化”Ab保持与原始Ab类似的抗原特异性。

[0048] “抗抗原”Ab系指特异性结合抗原的Ab。举例而言,抗CCR8 Ab为特异性结合CCR8的Ab,而抗PD-1 Ab为特异性结合PD-1的Ab。如本文中所使用,“抗PD-1/抗PD-L1”Ab为用于破坏PD-1/PD-L1信号传导路径的Ab,其可为抗PD-1 Ab或抗PD-L1 Ab。

[0049] Ab的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”系指Ab(例如,mAb)的一或多个片段,其保留特异性结合由完整Ab结合的抗原的能力。

[0050] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”(“ADCC”)系指在体外或活体内细胞介导的细胞毒性活性,其中在效应细胞表面上表达Fc受体(FcR)的非特异性效应细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性白血球及嗜酸性白血球)识别结合目标细胞上的表面抗原的Ab的Fc区且有效地溶解目标细胞。原则上,可触发任何具有活化性FcR的效应细胞以介导ADCC。本发明的用于人类个体的治疗性Ab优选为抗hCCR8 Ab,其已经特定修饰以介导增强的针对表达CCR8的细胞的ADCC活性。Ab的ADCC活性可如例如实施例17-20中的任一者中所

描述来测量。

[0051] 本发明的经修饰的Ab的“增强的ADCC”或“增强的ADCC活性”系指大于由未经修饰的Ab诱导的ADCC的ADCC活性水平。举例而言，本发明的呈现增强的ADCC的经修饰的抗CCR8IgG1 Ab为Ab的经修饰的形式，其与具有原生IgG1恒定域的Ab相比诱导更大的ADCC。未经岩藻糖基化(nf)的mAb为经修饰的Ab的实例，其经由改良的IgG与活化性Fc γ RIIIA的结合来诱导增强的ADCC。在某些实施方案中，ADCC活性的增强程度为EC₅₀降低至少2倍，优选至少10倍，更优选至少100倍，例如通过NK细胞溶解测定法(例如，实施例17中所描述的NK细胞溶解测定法)中的细胞溶解的EC₅₀的降低所测量。

[0052] “癌症”系指特征在于身体中的异常细胞的不受控生长的广泛各种疾病群。不受控的细胞分裂及生长分裂以及生长引起形成恶性肿瘤，其侵袭相邻组织且亦可经由淋巴系统或血流转移至身体的远程部分。

[0053] “C-C基序趋化因子受体8”(“CCR8”；在本领域亦称为例如CY6、TER1、CCR-8、CKRL1、CDw198、CMKBR8、GPRCY6、CMKBRL2或CC-CKR-8)为七次跨膜GPCR；已证实此GPCR主要表达于瘤内FOXP3^{hi} Treg上。如本文中所使用，术语“CCR8”包括人CCR8(hCCR8)、hCCR8的变异体、同功异型物、物种同源物，诸如小鼠CCR8(mCCR8)，及与hCCR8具有至少一个共同表位的类似物。完整的hCCR8及mCCR8氨基酸序列可分别在 GENBANK® 寄存编号AAI07160.1及NP_031746.1中发现。

[0054] “细胞表面受体”系指表达于细胞表面上的分子或分子复合物，其能够接收信号且跨越细胞的质膜发送信号。

[0055] “效应功能”系指Ab Fc区与FcR或配体的相互作用，或由其引起的生物化学事件。例示性“效应功能”包括C1q结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、FcR结合、Fc γ R介导的效应功能，诸如ADCC及Ab依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)，及细胞表面受体(例如，B细胞受体；BCR)的下调。此类效应功能通常需要Fc区与结合域(例如，抗体可变域)组合。

[0056] “Fc受体”或“FcR”为结合免疫球蛋白的Fc区的受体。结合IgG Ab的FcR包含Fc γ R家族的受体，包括这些受体的对偶基因变异体及交替剪接形式。Fc γ R家族由三种活化性受体(在小鼠中，Fc γ RI、Fc γ RIII及Fc γ RIV；在人类中，Fc γ RIA、Fc γ RIIA及Fc γ RIIIA)及一种抑制性受体(Fc γ RIIB)组成。人Fc γ R的各种特性概述于表1中。大部分先天性效应细胞类型共同表达一或多种活化性Fc γ R及抑制性Fc γ RIIB，而NK细胞在小鼠及人类中选择性地表达一种活化性Fc受体(在小鼠中，Fc γ RIII，且在人类中，Fc γ RIIIA)而不表达抑制性Fc γ RIIB。

[0057] 表1. 人Fc γ R的特性

Fc γ	对偶基因变异体	对人IgG的亲和力	同型偏好	细胞分布
Fc γ RI	未描述	高(K_D 为约10 nM)	IgG1=3>4>2	单核细胞、巨噬细胞、经活化的嗜中性白血球、树突状细胞?
Fc γ RIIA	H131	低至中等	IgG1>3>2>4	嗜中性白血球、单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性白血球、树突状细胞、血小板
	R131	低	IgG1>3>4>2	
Fc γ RIIA	V158	中等	IgG1=3>>4>2	NK细胞、单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、嗜酸性白血球、树突状细胞?
	F158	低	IgG1=3>>4>2	
Fc γ RIIB	I232	低	IgG1=3=4>2	B细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、肥大细胞
	T232	低	IgG1=3=4>2	

[0058] “Fc区”(片段可结晶区)或“Fc域”或“Fc”系指Ab的重链的C端区,其介导Ig与宿主组织或因子的结合,包括与位于免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)上的FcR或经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。因此,Fc区为包含Ab的恒定区(排除第一恒定区Ig域)的多肽。在IgG、IgA及IgD Ab同型中,Fc区由两个来源于Ab的两个重链的第二(C_{H2})及第三(C_{H3})恒定域的一致蛋白质片段构成;IgM及IgE Fc区在各自多肽链中的三个重链恒定域(C_H 域2-4)。对于IgG,Fc区包含Ig域C γ 2及C γ 3以及C γ 1与C γ 2之间的铰链。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可变化,但人IgG重链Fc区通常定义为自位置C226或P230处的氨基酸残基延伸至重链的C端,其中编号系根据EU索引,如Kabat中。人IgG Fc区的 C_{H2} 域自约氨基酸231延伸至约氨基酸340,而 C_{H3} 域位于Fc区中的 C_{H2} 域的C端侧,亦即,其自IgG的约氨基酸341延伸至约氨基酸447。如本文中所使用,Fc区可为原生序列Fc或变异型Fc。

[0059] 如本文中所使用,“岩藻糖基化”及“非岩藻糖基化”分别系指Ab的位置N297处的N-连接的聚糖上存在及不存在核心岩藻糖残基。除非另有指示或由上下文清楚,否则Ab的Fc区中的氨基酸残基编号系根据EU编号惯例(如Kabat等人,1991中的EU索引)。

[0060] “免疫反应”系指脊椎动物内的针对外来因子的生物反应,该反应保护生物体对抗这些因子及由其所引起的疾病。免疫反应系由免疫系统的细胞(例如,T淋巴细胞、B淋巴细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜酸性白血球、肥大细胞、树突状细胞或嗜中性白血球)及由这些细胞中的任一者或肝脏产生的可溶性大分子(包括Ab、细胞因子及补体)的作用介导,该作用引起选择性靶向、结合、损害、破坏和/或消除脊椎动物体内的侵入病原体、感染病原体的细胞或组织、癌性或其他异常细胞,或在自身免疫或病理性炎症的情况下,正常人类细胞或组织。

[0061] 术语“免疫疗法”系指通过包含诱导、增强、抑制或以其他方式改变免疫反应的方法来治疗罹患疾病或具有感染或经历疾病复发的风险的个体。

[0062] 术语“单药疗法”系指单一类型的治疗,诸如向患者施用单一药物,或仅使用放射疗法或手术来治疗疾病或病状。若在同一个治疗过程中,药物本身的给药系在另一类型的用于疾病或病状的治疗(诸如其他药物的给药)之前或之后进行,则其不组成单药疗法。

[0063] 相比之下,“组合疗法”系指组合至少两种类型的疗法的治疗方法,诸如向患者施用两种或更多种药物,或施用药物加放射疗法或手术,以治疗疾病或病状。此两种或更多种治疗无需并行地递送至患者,但仍为同一个治疗过程的一部分。在某些实施方案中,同时施

用不同疗法。在其他实施方案中，一种疗法的给药与至少一种其他疗法的给药重迭。在其他实施方案中，依序施用不同疗法。

[0064] “增强免疫反应”意谓提高个体中的免疫反应的有效性或效能，该免疫反应可为现有的或所诱导的免疫反应。此有效性及效能的提高可例如通过以下来实现：减少或克服抑制内源性宿主免疫反应的机制、刺激增强内源性宿主免疫反应的机制或增强由免疫治疗剂引发的免疫反应。

[0065] “程序性死亡-1” (PD-1) 系指属于CD28家族的免疫抑制性受体，其在活体内主要表达于先前经活化的T细胞上，且结合两种配体，即PD-L1及PD-L2。如本文中所使用，术语“PD-1”包括人PD-1 (hPD-1)、hPD-1的变异体、同功异型物及物种同源物，以及与hPD-1具有至少一个共同表位的类似物。完整的hPD-1氨基酸序列可在GENBANK®寄存编号U64863中发现。

[0066] “程序性死亡配体-1” (PD-L1) 为PD-1的两种细胞表面糖蛋白配体之一 (另一者为PD-L2)，其在结合PD-1后下调T细胞活化及细胞因子分泌。如本文中所使用，术语“PD-L1”包括人PD-L1 (hPD-L1)、hPD-L1的变异体、同功异型物及物种同源物，以及与hPD-L1具有至少一个共同表位的类似物。完整的hPD-L1序列可在GENBANK®寄存编号Q9NZQ7中发现。

[0067] “个体”包括任何人类或非人类动物。术语“非人类动物”包括 (但不限于) 脊椎动物，诸如非人类灵长类动物、羊、犬，及啮齿动物，诸如小鼠、大鼠及天竺鼠。在优选的实施方案中，个体为人类。术语“个体”及“患者”在本文中可互换地使用。

[0068] 药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”为药物或药剂在单独或与另一治疗剂组合使用时，保护个体避免疾病发作或促进疾病消退的任何量，疾病消退系由以下证明：疾病症状的严重程度降低、无疾病症状期的频率及持续时间增加、预防或减少由疾病病痛引起的损伤或功能障碍，或以其他方式改善个体中的疾病症状。此外，关于治疗的术语“有效”及“有效性”包括药理学有效性及生理学安全性。药理学有效性系指药物促进患者中的疾病消退，例如癌症消退的能力。生理学安全性系指由药物的给药所引起的可接受的程度的毒性，或在细胞、器官和/或生物体层面的其他不良生理学作用 (副作用)。治疗剂的功效可使用本领域技术人员已知的各种方法评估，诸如在临床试验期间在人类个体中、在预测人类中的功效的动物模型系统中或通过在外在体外测定法中分析药剂的活性。

[0069] 作为肿瘤的治疗的实例，与未经治疗的个体相比，治疗有效量的抗癌剂优选抑制细胞生长或肿瘤生长达至少约20%，优选至少约40%，更优选至少约60%，甚至更优选至少约80%，且更优选达约100%。可在预测人类肿瘤中的功效的动物模型系统中评估药剂或治疗抑制肿瘤生长的能力，该动物模型系统诸如CT26结肠腺癌、MC38结肠腺癌、SA1N纤维肉瘤、4T1乳腺癌及MB49膀胱癌小鼠肿瘤模型中的任一者。或者，可使用本领域技术人员已知的测定法，通过评估药剂或治疗在体外抑制细胞生长的能力来测量肿瘤生长抑制。在本发明的优选的实施方案中，在人类个体中可观测到肿瘤消退且持续至少约30天，更优选至少约60天或甚至更优选至少约6个月的周期。

[0070] 药物的治疗有效量包括“预防有效量”，其为在单独或与另一治疗剂组合施用具有产生疾病 (例如，具有产生癌症的风险的患有癌前病状的个体) 或经历疾病复发的风险的个体时抑制疾病 (例如，癌症) 的产生或复发的药物的任何量。在优选的实施方案中，预防有效量完全防止疾病的产生或复发。“抑制”疾病的产生或复发意谓降低疾病的产生或复发的可

能性,或完全防止疾病的产生或复发。

[0071] 个体的“治疗”或“疗法”系指对个体进行的任何类型的介入或方法,包括施用活性剂,其目标为逆转、缓解、改善、抑制、减缓或预防与疾病相关联的症状、并发症或病状或生物化学标志的发作、进展、发展、严重程度或复发。

[0072] 如本文中所使用,不定冠词“一”应理解为指任何所叙述或列举的组分中的“一者或更多者”。

[0073] 当应用于数值时,术语“约”系指合理地近似于所述值且在如由一般本领域技术人员所确定的可接受的误差范围内的值,该可接受的误差范围将部分取决于如何测量或测定该值,亦即,测量系统的极限。举例而言,“约”可意谓所述参考值的加或减50%的范围,优选加或减25%的范围,或更优选加或减10%的范围。当在本申请中提供特定值时,除非另有说明,否则“约”的含义应理解为在该特定值的根据本领域的实践的可接受的误差范围内。

[0074] 术语“实质上相同”或“基本上相同”系指两个或更多个数值、组合物或特征之间的足够高的相似度,使得本领域技术人员将认为这些值、组合物或特征之间的差异在所测量的特性的情形下将存在极小或不存在生物学和/或统计显著性。所测量的数值数之间的差异可例如小于约50%,优选小于约25%,且更优选小于约10%。

[0075] 如本文中所描述,除非另有指示,否则任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应理解为包括在所述范围内的任何整数值及(在适当时)其分数(诸如整数的十分之一及百分之一)。

[0076] 在以下子部分中进一步详细描述本发明的各种方面。

[0077] 高免疫抑制性肿瘤浸润性Treg中的CCR8的特异性表达

本文中报道的各种实验说明CCR8由人类肿瘤中的Tregs特异性表达,且与CCR4(一种当前正在经历临床试验的Treg消耗目标)不同,CCR8在抑制性肿瘤Treg上选择性表达且在促炎性Teff上极少表达。癌症基因体图谱(TCGA;国家癌症研究所(National Cancer Institute),2021)中的人CCR8及FOXP3基因-基因相关性的分析(实施例1)表明在大部分癌症类型中,CCR8表达与FOXP3(Treg的主要转录调节因子)具有最高相关性(图1A)。CCR8表达于肿瘤FOXP3^{hi} Tregs上,但在外周血液中的Treg及Teff上很少观测到。CCR8亦选择性地表达于HCC肿瘤样品中的FOXP3^{hi}淋巴细胞上,但未在患者肿瘤中的FOXP3^{mid}及FOXP3^{neg} CD8以及CD4⁺ Teff中表达(图1B)。CCR8表达与较高的FOXP3表达量及Treg的标准标志物(IL2RA、IKZF2、BATF)含量相关联,而较低的CCR8表达与细胞毒性T细胞标志物(GZMA、CD8A;图1C)相关联。

[0078] 比较不同的Treg相关分子的表达概况(实施例3),证实与来自患者匹配血液的Treg相比,CCR8在肿瘤相关FOXP3⁺ Treg上更多地表达,而来自肿瘤及血液的Treg上的CCR4、CTLA-4及CD25的表达存在极小差异(图2A)。与外周血液Treg相比,FOXP3⁺肿瘤Treg上的CCR8的以每个细胞计的高丰度(图2B)与肿瘤及外周血液中的CD4⁺ Tconv(图2C及D)及CD8⁺ T细胞(图2E及F)上的CCR8表达的低出现率共同表明,CCR8代表在较低的损害抗肿瘤Teff细胞群体的风险下靶向肿瘤Treg的高选择性治疗性标志物。

[0079] 与人类肿瘤相关联的T淋巴细胞的不同子集中的CCR8的表达量的流式细胞分析(实施例4)表明CCR8由大部分肿瘤驻留Treg表达(中值为82%),如由FOXP3所定义(图3A)。相比之下,显著较低比例的肿瘤浸润性CD4⁺ T细胞及CD8⁺ T细胞表达CCR8(中值分别为

12.65%及4.55%;图3B)。尽管一小部分CD4⁺ Tconv细胞表达CCR8,但Treg上的以每个细胞计的CCR8的表达量明显高于CD4⁺ Tconv细胞(中值MFI 2106对比132, $P < 0.0001$),而CD8⁺ T细胞的CCR8表达量系可忽略的(图3B)。亦证实外周血液中的Treg表达CCR8,但明显低于肿瘤浸润性Treg上的表达量(图3C)。

[0080] 亦通过流式细胞术来分析CCR8在不同人Treg亚群上的差异性表达(实施例5)。在来自健康个体的PBMC中,发现CCR8主要表达于外周血液Treg上,但与肿瘤浸润性Treg上的表达(中值为约82%) (参考图3A)相比,仅在一小部分(中值为21%)这些外周Treg上表达(图4A)。因此,归因于外周Treg群体中的CCR8⁺ Treg的比例较低,抗CCR8 Ab介导的细胞消耗可能不会显著影响外周Treg腔室。此暗示与不加区别的非肿瘤相关Treg的消耗相比,与通过靶向CCR8来消耗肿瘤相关Treg相关联的自身免疫毒性的风险较低。在Treg群体内,CCR8在效应子内存群体中更多地表达且在中心记忆细胞中的表达量较低,且原生Treg(图4B)或常规CD4⁺ T细胞(图4C)上表达极少的CCR8。在癌症患者中,以每个细胞计,肿瘤浸润性Treg上的CCR8表达高于来自外周血液的Treg,如通过经结合的抗CCR8 Ab的MFI所测量(图4D)。

[0081] 与临床上的其他靶向Treg的nf药剂(CCR4-莫格利珠单抗(mogamulizumab)及CTLA-4-Ipi-nf)相比,CCR8在与不良存活率相关联的FOXP3^{hi}肿瘤Treg的活化程度及免疫抑制性最高的子集上特异性表达(Plitas等人,2016;Wang等人,2019),有效排除表达颗粒酶及其他效应细胞因子的Teff。将两种黑素瘤肿瘤及一种RCC肿瘤针对FOXP3及CCR8表达进行解离及染色(实施例6)。图5表明CCR8在代表活化程度最高的Treg的免疫抑制性最高的CD4⁺ FOXP3^{high} Treg群体上表达。在存在明显的FOXP3^{mid}群体的黑素瘤样品中,在FOXP3^{high} T细胞中发现大部分CCR8表达,其中CCR8表达量明显低于FOXP3^{mid}及FOXP3^{neg}肿瘤T细胞,该等T细胞主要为表达颗粒酶及其他效应细胞因子的效应细胞。在大部分患者FOXP3⁺ T细胞呈现高FOXP3含量的RCC样品中,CCR8表达与FOXP3表达重迭。与可为经活化的常规T细胞或静止Treg的FOXP3^{mid} CD4⁺ T细胞形成对比,已证实FOXP3^{high} CD4⁺ T细胞为真正的Treg。

[0082] 检验CCR8⁺对比CCR8⁻肿瘤浸润性T细胞群体中的功能相关分子的表达(实施例7)。证实来自患者肿瘤样品的CCR8⁺细胞共同表达具有潜在免疫抑制功能的若干蛋白质,诸如CD25、IL1R2及CD39(图6A-D),而未在CCR4⁺ T细胞中发现类似的富集作用(图7A-D)。使用HLA-DR作为活化标志物,CCR8表达亦与高HLA-DR表达量相关(图8A)且因此鉴定经活化的Treg,而CCR4表达并非如此(图8B)。因此,CCR8⁺细胞的消耗将移除表达CD25、CD39及IL1R2的经活化的免疫抑制性Treg,而CCR4靶向消耗将不会移除表达这些分子的Treg。此外,在CD4⁺ T细胞的CCR8⁺部分中,用佛波醇(phorbol) 12-豆蔻酸13-乙酸(PMA)及离子霉素离体刺激经解离的患者肿瘤细胞诱导最小的IL-2、IFN γ 及颗粒酶B产生(图9A-C)。相比之下,CCR4⁺CD4⁺ T细胞为IFN γ 及IL-2的主要生产者(图10A及B),表明CCR4⁺而非CCR8⁺细胞的靶向消耗可能对抗肿瘤免疫不利。

[0083] 实施例1-7中公开及以上概述的数据表明,并非肿瘤中的所有CD4⁺FOXP3⁺ T细胞皆表达CCR8,且CCR8⁺部分似乎代表FOXP3⁺细胞的免疫抑制性较高的子集。因此,CCR8表达将肿瘤中富集的高抑制性Treg的子集标记且可阻碍抗肿瘤免疫。CCR8表达对肿瘤特异性Treg且特定地,活化程度及免疫抑制性最高的CD4⁺ FOXP3^{high}瘤内Treg的高特异性使得CCR8成为使用抗CCR8 Ab经由ADCC来介导这些高免疫抑制性Treg的消耗的最佳目标。

[0084] 因此,在本文中所描述的实验中产生抗hCCR8 mAb(实施例8)且进行筛选,以鉴定呈现用于治疗癌症的治疗性Ab所需的多种特性的Ab(实施例9-31)。本文中证明,替代性小鼠抗mCCR8-mIgG2a Ab在多种小鼠肿瘤模型中有效抑制肿瘤生长,且未经岩藻糖基化(nf)的抗hCCR8 Ab在离体患者肿瘤样品中及在体外消耗人类肿瘤Treg,同时避开驱动抗肿瘤免疫反应的促炎性CD4⁺及CD8⁺ Teff细胞(实施例20及22)。消耗肿瘤相关Treg可降低其免疫抑制作用且藉此增强整体免疫反应以对抗癌症。此外,因为CCR8极少在外周血液或其他组织中的Treg及Teff上表达,因此靶向Treg可产生最小的毒性风险。相比之下,在体外抗hCCR4-IgG1-nf治疗引起外周及肿瘤微环境中的Treg及CD4⁺ Tconv细胞的消耗(实施例20及22)。此与莫格利珠单抗(抗CCR4)在临床上消耗外周血液中的Teff群体的证据(Kurose等人,2015)一致。

[0085] 产生抗hCCR8 MAbs

趋化因子受体,包括CCR8,由于其在细胞表面上不引人注目且相对难以实现Ab结合而在传统上为“极难以研发针对其的Ab的抗原”(WO 2007/044756)。又,所产生的针对肽(对应于趋化因子受体的胞外域)的Ab通常不能识别细胞上的完整受体,此很可能系由于二级结构中的差异。归因于这些困难,产生针对趋化因子受体的Ab的工作的成功率较低(WO 2007/044756)。CCR8为尤其困难的GPCR,其已被描述为“极具挑战性”的产生针对其的Ab的目标(Harbour BioMed,2020)。

[0086] 通过用表达hCCR8的细胞对小鼠进行免疫接种来产生抗hCCR8 Ab的最初成果并不成功。然而,在尝试用各种hCCR8抗原及这些抗原的各种组合对不同啮齿动物进行免疫接种之后,在本发明的研究中产生抗hCCR8 mAb(实施例8)。

[0087] 啮齿动物的免疫接种

通过用免疫原对不同啮齿动物(包括普通C57BL/6小鼠、表达人Ig谱系的转基因小鼠的不同品系、特异性产生的CCR8^{-/-}基因剔除小鼠品系、大鼠及仓鼠)进行免疫接种来产生人源化或人类抗CCR8 mAb,该等免疫原包含各种hCCR8抗原,包括过表达hCCR8的中国仓鼠卵巢(CHO)、小鼠BAF3及人类HEK 293F细胞或来自这些细胞的经纯化的质膜。用化学合成肽对这些免疫原进行增强免疫,该等化学合成肽系来自与牛血清白蛋白(BSA)或钥孔血蓝蛋白(KLH)结合的hCCR8N端(hCCR8的残基1-35),该N端的重要的处在于在位置15和/或17处含有经单或双硫酸化的酪氨酸残基。接着,将非转基因小鼠中产生的某些mAb修饰成人源化或嵌合衍生物。

[0088] 蛋白质通常显示转译后修饰,其中一些(例如,糖基化)已被充分地研究及证明。相比之下,极少研究某些细胞外酪氨酸残基的硫酸化且迄今为止,仅存在32种被证明含有硫酸化酪氨酸的经确认的分子(Mehta等人,2020)。尽管尚待发现其他具有硫酸化酪氨酸的蛋白质,但预计硫酸化酪氨酸极稀少(Moore,2003)。作为化学部分,其与所有其他氨基酸明显不同且因此代表用于产生具有极高特异性及低脱靶结合的极佳焦点。包括CCR8的趋化因子受体组成已被充分证明在N端上具有硫酸化酪氨酸的极少数蛋白质类别中的一种(Ludeman及Stone,2014)。对于若干种这些受体,已发现酪氨酸硫酸化对于配体(亦即,趋化因子)接合而言为重要的(Zhu等人,2011)。因此,有可能的是,与酪氨酸硫酸盐接合的Ab将破坏趋化因子与趋化因子受体之间的结合且藉此阻止趋化因子受体活化。如本文中的其他地方所论述,尤其关注本发明的结合表位的Ab,该表位包含具有序列V₁₂T₁₃D₁₄Y₁₅Y₁₆P₁₇D₁₈

${}_{9I_{20}F_{21}S_{22}}$ (SEQ ID NO:109) 的肽内的至少一个氨基酸,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) 的肽内的2、3、4、5、6、7、8、9、10个或所有氨基酸且特定地,其中氨基酸Y15及Y17经硫酸化,且实施例11展示mAb 4A19以约1.6nM的 K_D 结合经双硫酸化的CCR8N端(参见表5)。

[0089] 抗CCR8 mAb的减少的岩藻糖基化、非岩藻糖基化及低岩藻糖基化

可通过修饰在N297残基(EU编号)处连接至各Fc片段的聚糖部分来增强Ab与Fc γ R的相互作用。特定地,经由在不改变抗原结合或补体依赖性细胞毒性(CDC;Natsume等人,2009)的情况下的IgG与活化性Fc γ RIIIA的经改良的结合,缺少核心岩藻糖残基可显著增强ADCC.nf Ab与人Treg上的CCR8的结合可促进NK细胞上的Fc γ R与骨髓单核细胞性Teff的接合。此Fc γ R接合驱动NK细胞活化,引起增强的通过ADCC进行的Treg杀伤。存在有说服力的证据表明去岩藻糖基化肿瘤特异性Ab在活体内小鼠模型中转译成增强的治疗活性(Nimmerjahn及Ravetch,2005;Mossner等人,2010)。

[0090] Ab糖基化的修饰可通过例如在具有经改变的糖基化机构的宿主细胞中表达Ab来实现。本文中所公开的某些抗hCCR8 mAb具有降低或消除的岩藻糖基化且呈现增强的ADCC,其尤其适用于本发明的方法。因此,本文中所公开的抗hCCR8 mAb可以具有降低或消除的岩藻糖基化的形式产生(例如,通过在具有经改变的糖基化机构的细胞中表达抗hCCR8 mAb)且因此呈现增强型的ADCC,其尤其适用于本发明的方法。具有经改变的糖基化机构的细胞已描述于本领域,且可用作表达本发明的重组Ab以藉此产生具有经改变的糖基化的Ab(例如,mAb)的宿主细胞。举例而言,细胞株Ms704、Ms705及Ms709不具有岩藻糖基转移酶,FUT8(α -(1,6)岩藻糖基转移酶;参见美国公开第2004/0110704号;Yamane-Ohnuki等人,2004),使得这些细胞株中表达的Ab在其碳水化合物中不具有岩藻糖。EP 1176195亦描述具有功能性破坏的FUT8基因的细胞株以及具有极少或没有用于将岩藻糖添加至N-乙酰基葡萄糖胺(其与Ab的Fc区结合)的活性的细胞株,例如,大鼠骨髓瘤细胞株YB2/0(ATCC CRL 1662)。本领域已描述许多其他用于在具有降低的岩藻糖基化的Ab的情况下制备Ab的方法。通过不具有岩藻糖基化所必需的FUT8酶的Expi293Fut8^{-/-}基因剔除细胞(Thermo Fisher Scientific, San Diego,CA)中的表达来产生本文中所公开的低岩藻糖基化或nf嵌合、人源化或人类抗hCCR8 Ab。

[0091] 因为nf Ab与岩藻糖基化Ab相比呈现显著增强的ADCC,Ab制剂无需完全不含岩藻糖基化重链即可用于本发明的方法中。岩藻糖基化重链的残基含量将不会显著干扰实质上nf重链的制剂的ADCC活性。在完全胜任将核心岩藻糖添加至N-聚糖的常规CHO细胞中产生的Ab仍可包含百分的几至15%的nf Ab.nf Ab可呈现约10倍更高的对CD16的亲和力,及ADCC活性的高达30至100倍增强,因此即使nf Ab的比例的少量增加亦可显著提高制剂的ADCC活性。在培养物中,任何包含与正常CHO细胞(例如,具有未经改变的糖基化机构的野生型CHO细胞)中所产生的相比更多的nf Ab的制剂可呈现某一程度的增强的ADCC。此类Ab制剂在本文中被称作具有降低的岩藻糖基化的制剂。取决于自正常CHO细胞(例如,野生型CHO细胞)获得的原始非岩藻糖基化程度,降低的岩藻糖基化制剂可包含少至50%、30%、20%、10%及甚至5%nf Ab。降低的岩藻糖基化可在功能性上定义为与在正常CHO细胞中制备的Ab相比且不参考nf物质的任何固定百分比,呈现约2倍或更大的ADCC的增强的制剂。

[0092] 然而,如本文中所使用,除非另有指示,否则在结构上定义非岩藻糖基化程度。特

定地,“未经岩藻糖基化”(nf)或“去岩藻糖基化”(同义使用的术语)的Ab制剂为包含大于95%nf Ab重链(包括100%)的Ab制剂;“低岩藻糖基化”系指其中80至95%的重链不具有岩藻糖的Ab制剂;且“低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化”系指其中80%或更多的重链不具有岩藻糖的Ab制剂。

[0093] Ab制剂的岩藻糖基化程度可通过本领域已知的方法测定,包括(但不限于)凝胶电泳、液相层析(LC)及质谱(MS)。出于本发明的目的,除非另有指示,否则Ab制剂的岩藻糖基化程度系通过亲水相互作用层析(或亲水相互作用液相层析,HILIC)测定。为了测定Ab制剂的岩藻糖基化程度,用PNGase F对样品进行变性处理以使N-连接的聚糖裂解,接着分析岩藻糖含量。全长Ab链的LC/MS为用于侦测Ab制剂的岩藻糖基化程度的替代性方法,但质谱的定量性固有地较小。

[0094] 治疗性抗hCCR8 mAb必须具有高ADCC潜力

由于吾人在初步免疫接种实验中产生抗CCR8 Ab时遇到的极大困难,最终如上文及实施例8中所描述用多种抗原进行免疫接种。如实施例9中所描述来筛选所产生的杂交瘤,以确认结合CCR8及CCR8N端肽的Ab。如实施例10中所描述将所选择的小鼠Ab人源化。

[0095] 还提供用于产生针对CCR8的Ab的方法,该方法包含在包含一或多次免疫接种的免疫接种计划表中用一或多种hCCR8抗原将啮齿动物免疫接种至少一次,其中免疫接种计划表在至少一次免疫接种中包括施用hCCR8抗原,该抗原为包括hCCR8的残基Y15及Y17且其中残基Y15及Y17为磺基酪氨酸残基的KLH结合的hCCR8肽。优选地,残基Y15及Y17皆为磺基酪氨酸残基。

[0096] 任选地,hCCR8肽至少包含hCCR8的N端的最末尾处的25、30或35个氨基酸或由其组成。任选地,hCCR8肽由hCCR8的N端的最末尾处的35个氨基酸组成。

[0097] 任选地,啮齿动物为小鼠、大鼠或仓鼠。优选地,啮齿动物为小鼠。

[0098] 任选地,在至少一次免疫接种中用表达hCCR8的细胞或优选地,自表达CCR8的细胞分离的质膜富集部分(单独或与KLH结合的hCCR8肽组合)对啮齿动物进行免疫接种。任选地,免疫接种计划表包括用表达hCCR8的HEK 293F细胞及用KLH结合的N端hCCR8肽对啮齿动物进行免疫接种。任选地,免疫接种计划表包括用表达hCCR8的BAF3细胞的质膜富集部分及用KLH结合的hCCR8肽对啮齿动物进行免疫接种。

[0099] 在某些方面中,本发明涉及分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其特异性结合表达于细胞表面上的CCR8且介导通过ADCC进行的表达CCR8的细胞的消耗。在某些实施方案中,与mAb或其抗原结合部分结合的CCR8为hCCR8,其序列系如SEQ ID NO:1所示。在其他实施方案中,CCR8为mCCR8,其序列系如SEQ ID NO:120所示。

[0100] 人IgG1及IgG3Ab同型能够经由结合Fc γ 受体,特定地,由人类NK细胞及单核细胞表达的CD16(Fc γ RIIIa)受体来介导ADCC(参见表1)。许多商品化的治疗性Ab具有人IgG1同型,其在与其他人Ab同型相比时可诱导强ADCC及CDC。此外,治疗性IgG1 Ab在血液中具有经由结合新生Fc受体(FcRn)而介导的长期稳定性。若干治疗性Ab(包括抗CD20利妥昔单抗(rituximab)(RITUXAN®)(Dall'Ozzo等人,2004)、抗Her2曲妥珠单抗(trastuzumab)(HERCEPTIN®)(Gennari等人,2004)、抗肿瘤坏死因子- α (抗TNF- α)英利昔单抗(infliximab)(REMICADE®)(Louis等人,2004)及抗RhD(Miescher等人,2004))的活性系至少部分由ADCC介导。

[0101] 在所公开的本发明的某些实施方案中,抗CCR8 mAb或其抗原结合部分包含具有人IgG1或IgG3同型的重链恒定区。在优选的实施方案中,抗CCR8 mAb或其抗原结合部分具有人IgG1。

[0102] 本发明还提供包含经修饰的重链恒定区的经修饰的抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分,其与相应的未经修饰的mAb或其抗原结合部分相比以较高亲和力结合Fc γ R且介导增强的ADCC。在某些实施方案中,经修饰的抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分至少介导:(a) 增强约2倍的ADCC活性;(b) 增强约5倍的ADCC活性;(c) 增强约10倍的ADCC活性;(d) 增强约30倍的ADCC活性,或(e) 增强约100倍的ADCC活性,例如通过NK细胞溶解测定法(例如,实施例17中描述的NK细胞溶解测定法)中的细胞溶解的EC₅₀的降低所测量。在某些实施方案中,经修饰的抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分包含经修饰的IgG1重链恒定区,其呈现降低的岩藻糖基化作用。

[0103] 在其他实施方案中,经修饰的抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分包含低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的经修饰的IgG1重链恒定区。在某些其他实施方案中,经修饰的mAb或其抗原结合部分包含经修饰的IgG1重链恒定区,该重链恒定区含有介导增强的ADCC的一种突变或多种突变。在其他实施方案中,该突变或多种突变系选自: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。在某一实施方案中,经修饰的抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分包含低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的经修饰的IgG1重链恒定区,且进一步含有介导增强的ADCC的一种突变或多种突变,诸如上文所列举。

[0104] 介导ADCC的抗hCCR8 MAb的功能性筛选

在功能上筛选人、人源化及嵌合抗hCCR8 mAb克隆以鉴定呈现治疗性Ab所需的特性的Ab,包括满足以下条件的Ab:以高亲和力结合hCCR8(实施例11);特异性结合表达CCR8的人类细胞(实施例14);阻断CCL1配体与CCR8的结合(实施例15);在结合表达CCR8的细胞的表面上的CCR8时,介导此类细胞(包括Treg)的ADCC(实施例17、19及20);不引起细胞CCR8的内化(实施例21);在在体外(实施例22)及离体人类肿瘤切片样品(实施例20)中促进人类肿瘤相关Treg的消耗;特异性介导肿瘤Treg的消耗,同时避开正常组织中的CCR8⁺ T细胞(实施例24);及当以单药疗法形式或与检查点抑制剂组合施用小鼠时,降低临床前小鼠肿瘤模型中的肿瘤生长(实施例23-29)。

[0105] 在初步证实以亚奈莫耳EC₅₀值结合人类细胞上的CCR8且在与不表达CCR8的不同人类组织不具有交叉反应性的情况下特异性结合表达CCR8的细胞之后,选择用于进一步表征的克隆。通过下一代测序来对编码这些Ab中的可变区的DNA进行测序且基于序列同源性及其有限的潜在序列可靠性(例如,天冬酰胺去酰胺化、甲硫氨酸氧化及糖基化位点),针对多样性来选择克隆。基于其介导表达CCR8的细胞的ADCC的效能、结合动力学及序列家族多样性,针对认为治疗性Ab所需的功能来进一步测试某些所选择的克隆mAb,包括抑制小鼠肿瘤模型中的肿瘤生长的能力,且经历序列优化以减少序列可靠性、优化结合亲和力及恢复胚系氨基酸。亦经由各种手段来分析所选择的mAb的生物物理学特性,该等手段诸如分析型尺寸排阻层析、毛细管等电聚焦、疏水性评估、热稳度及聚集潜力,以鉴定适用于进一步研究的克隆。

[0106] 抗CCR8 mAb对CCR8的结合亲和力的表征

本发明的某些抗CCR8 mAb以高亲和力结合hCCR8。Ab通常以高亲和力特异性结合其同源抗原,由1pM至10pM或更低的解离常数(K_D)反映。通常认为任何大于约100pM的 K_D 指示非特异性结合。如本文中所使用,“特异性结合”于抗原的IgG Ab系指以高亲和力结合抗原及实质上一致抗原,但不以高亲和力结合不相关抗原的Ab,高亲和力意谓具有约100nM或更低,优选约10nM或更低,更优选约5nM或更低且甚至更优选在约5nM与0.1nM之间或更低的 K_D 。若抗原呈现与既定抗原的高度序列一致性,例如,若其呈现与既定抗原的序列的至少80%、至少90%、优选至少95%、更优选至少97%或甚至更优选至少99%序列一致性,则其与既定抗原“实质上一致”。

[0107] 如本文中所使用,术语“ K_D ”意指特定Ab-抗原相互作用的解离常数,其系由 k_{off} 与 k_{on} 的比率(亦即, k_{off}/k_{on})获得且以莫耳浓度(例如,nM)表示。术语“ k_{on} ”系指Ab与其抗原的结合相互作用的结合速率或“进行速率(on rate)”,而术语“ k_{off} ”系指Ab-抗原复合物的解离速率。可使用本领域公认的方法测定Ab的 K_D 值,诸如表面等离子共振 (SPR)、动力学排除测定法 (KinExA®;Sapidyne Instruments,Boise,ID) 或生物层干涉术 (BLI;ForteBio,Fremont,CA)。通过不同方法测定的单一Ab的 K_D 值可显著不同,例如,高达1,000倍。因此,在比较不同Ab的 K_D 值时,重要的是,这些 K_D 值系使用相同方法测定。在未明确陈述时且除非上下文另有指示,否则本文中所公开的Ab结合的 K_D 值系使用BIACORE®生物传感器系统 (GE Healthcare,Chicago,IL) 通过SPR测定。

[0108] 亦可通过测定与表达CCR8的细胞株的结合的 EC_{50} (其为实现最大结合的一半的Ab的浓度) 来测量与目标 (诸如hCCR8) 结合的Ab的结合亲和力。mAb与表达CCR8的CHO、293F、Raji细胞株的结合的研究呈现低于1nM的 EC_{50} (图11A)。当与经活化的Treg结合时,这些Ab呈现更广泛范围的结合亲和力,其中小于一半的Ab呈现在小于1nM的 EC_{50} 下的结合 (图11A)。图11B中展示的所选择的mAb集合呈现在皮莫耳至奈莫耳范围内的 EC_{50} 。

[0109] 因此,在所公开的本发明的某些实施方案中,抗CCR8 mAb或其抗原结合部分按以下 EC_{50} 特异性结合表达人CCR8的CHO细胞:约10nM或更低;优选约5nM或更低;优选约2nM或更低;更优选约1.7nM或更低;更优选约1nM或更低;更优选约0.5nM或更低;及甚至更优选约0.1nM或更低。在某些优选的实施方案中,抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分以约0.1nM的 EC_{50} 结合表达hCCR8的CHO细胞。在某些其他优选的实施方案中,抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分以约1.7nM的 EC_{50} 结合表达hCCR8的CHO细胞。在某些实施方案中,mAb以约0.1nM与约10nM之间的 EC_{50} 结合。在某些其他实施方案中, EC_{50} 在约0.1nM与约2nM之间。在某些其他实施方案中, EC_{50} 在约0.5nM与约5nM之间。在某些优选的实施方案中, EC_{50} 在约1nM与约2nM之间。在其他实施方案中,mAb或其抗原结合部分以约0.5nM与约1nM之间的 EC_{50} 结合人hCCR8。在某些优选的实施方案中,通过实施例11中描述的结合测定法来测量 EC_{50} 值。

[0110] 在本发明的某些其他实施方案中,抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分按以下 EC_{50} 特异性结合经活化的人Treg:约50nM或更低、约14nM或更低、约10nM或更低;优选约5nM或更低;更优选约2nM或更低;更优选约0.5nM或更低;更优选约0.3nM或更低;甚至更优选约0.1nM或更低;且更优选约0.03nM或更低。在某些优选的实施方案中,抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分以约1.7nM的 EC_{50} 结合表达hCCR8的CHO细胞。在某些实施方案中,mAb以约0.03nM与约10nM之间的 EC_{50} 结合。在某些优选的实施方案中, EC_{50} 在约0.1nM与约5nM之间。在更优选

实施方案中,mAb或其抗原结合部分以约0.2nM与约2nM之间的 EC_{50} 结合人hCCR8。在某些优选的实施方案中,通过实施例11中描述的结合测定法来测量 EC_{50} 值。

[0111] 通过X射线结晶学证实,所选择的抗hCCR8 mAb (4A19) 的Fab片段结合表位,该表位包含hCCR8的N端肽中的残基15-21 (实施例11) 及表位的中心处的硫酸化酪氨酸-17残基(图12A)。因此,在某些实施方案中,本文中所描述的抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分结合人CCR8的N端表位,如通过X射线结晶学所测定,其中表位包含具有序列 $Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$ (SEQ ID NO:2) 的肽内的至少一个氨基酸。在某些优选的实施方案中,表位肽包含硫酸化酪氨酸-17残基。在某些实施方案中,表位包含具有SEQ ID NO:2的序列的肽内的2、3、4、5、6个或全部氨基酸。

[0112] 双硫酸化肽(Y_{15} 及 Y_{17} 硫酸化)与4A19 Fab片段的结合证实表位的中心的一致性及定向。其亦实现包含hCCR8的N端残基12-22 (VTDYYPDIFS;SEQ ID NO:109) 的延伸度更高的线形表位的定界(图12B)。来自自由单硫酸化肽揭示的表位的表位延伸可能是将hCCR8 N端肽的较大区段排序的磺基- Y_{15} 的结果,实现其与4A19Ab的相互作用的观测。在具有双硫酸化肽的结构中观测到的表位序列可组成由mAb 4A19结合的整个表位,因为此Ab系使用涉及多次免疫接种的免疫接种策略产生,该多次免疫接种系用hCCR8N端肽进行以增强对hCCR8N端的免疫反应。若N端肽中的其他氨基酸残基形成表位的一部分,则此将可能在晶体结构中发现,但其并非如此(图12B)。

[0113] 因此,在某些优选的实施方案中,由4A19结合的表位肽包含硫酸化酪氨酸-15及酪氨酸-17残基。在某些实施方案中,此肽的氨基酸 Y_{15} 和/或 Y_{17} 经硫酸化。在某些优选的实施方案中,此肽的氨基酸 Y_{15} 及 Y_{17} 皆经硫酸化。

[0114] 本发明提供一种Ab,例如mAb,或其抗原结合部分,其能够介导ADCC且特异性结合hCCR8 (其序列如SEQ ID NO:1所示) 上的表位,其中表位位于hCCR8的N端结构域中,该N端结构域在跨越约氨基酸残基15至21的肽($Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$;SEQ ID NO:2) 内,如通过X射线结晶学所测定。在某一实施方案中,表位包含具有序列 $Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$ (SEQ ID NO:2) 的肽内的至少一个氨基酸。在其他实施方案中,表位包含具有序列 $Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$ (SEQ ID NO:2) 的肽内的2、3、4、5、6个或全部氨基酸。在某些优选的实施方案中,表位包含具有SEQ ID NO:2的序列的全部7个氨基酸。

[0115] 本发明还提供一种Ab,例如mAb,或其抗原结合部分,其能够介导ADCC且特异性结合hCCR8 (其序列如SEQ ID NO:1所示) 上的表位,其中表位位于hCCR8的N端结构域中,该N端结构域在跨越约氨基酸残基12至22的肽($V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$;SEQ ID NO:109) 内,如通过X射线结晶学所测定。在某一实施方案中,表位包含具有序列 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109) 的肽内的至少一个氨基酸。在其他实施方案中,表位包含具有序列 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109) 的肽内的2、3、4、5、6、7、8、9、10个或全部氨基酸。在某些优选的实施方案中,表位包含具有SEQ ID NO:109的序列的全部11个氨基酸。在某些其他实施方案中,表位由具有SEQ ID NO:109的序列的肽组成。

[0116] 在本发明的某些方面中,抗CCR8 mAb或其抗原结合部分按以下 K_D 结合包含硫酸化tyr-15及tyr-17残基的hCCR8的N端肽(例如,在位置tyr-15及tyr-17处硫酸化的N端CCR8残基1-35的肽(CCR8-2磺基)):约100nM或更低;优选约50nM或更低;优选约10nM或更低;更优选约5nM或更低;更优选约1.6nM或更低;更优选约1.0nM或更低;且甚至更优选约0.5nM或更

低;且更优选约0.1nM或更低。在某些优选的实施方案中,抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分以约1.6nM的 K_D 结合N端表位肽,例如,在位置Tyr15及Tyr17处硫酸化的N端CCR8残基1-35的肽(CCR8-2磺基)。在某些实施方案中,mAb以约100nM与约0.1nM之间的 K_D 结合。在某些优选的实施方案中, K_D 在约50nM与约0.5nM之间。在更优选实施方案中,mAb或其抗原结合部分以约10nM与约1nM之间的 K_D 结合。在更优选实施方案中,mAb或其抗原结合部分以约2nM与约1nM之间的 K_D 结合。在某些优选的实施方案中,通过实施例11中所描述的SPR方法来测量 K_D 值。

[0117] 4A19Ab的结合需要hCCR8的N端中的酪氨酸(tyr-15及tyr-17)的硫酸化(参见实施例11)。若仅一个酪氨酸残基,即tyr-15磺基化,则4A19 Fab片段与N端肽不太紧密地结合,由高超过10倍且比双硫酸化的肽高约1,000倍的 K_D 证明,而若仅tyr-17经硫酸化,则存在亲和力的约10倍降低(表5)。因此,本发明提供一种抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分,其按以下方式结合包含单一硫酸化残基(tyr-17)的hCCR8(CCR8-磺基Y17)的N端肽:约100nM或更低;优选约50nM或更低;优选约25nM或更低;更优选约10nM或更低;且甚至更优选约1.0nM或更低。在某些优选的实施方案中,抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分以约20nM的 K_D 结合经单磺基化的表位肽。在某些实施方案中,mAb以约100nM与约1nM之间的 K_D 结合。在某些优选的实施方案中, K_D 在约50nM与约10nM之间。在更优选实施方案中,mAb或其抗原结合部分以约30nM与约20nM之间的 K_D 结合。在某些优选的实施方案中,通过实施例11中所描述的SPR方法来测量 K_D 值。

[0118] 抗hCCR8 MAb的组织交叉反应

因为将使用治疗性抗CCR8 mAb消耗表达CCR8的目标细胞,重要的是,mAb特异性结合所欲目标细胞,亦即,肿瘤浸润性Treg,且不与身体中的其他必需的细胞类型结合,该等必需的细胞的消耗将诱导毒性或不合需要的副作用。因此,针对与多种正常人类组织类型的结合来测试候选mAb(实施例14)。证实抗hCCR8 mAb 18Y12及4A19与主要在胸腺的髓质及皮肤的真皮中的稀少及分散的免疫细胞结合,而在所检验的许多其他组织中未观测到结合。观测到另一种mAb,16B13,非特异性结合PBMC及各种人类组织,包括淋巴器官及富含淋巴的组织中的免疫细胞,且结合其中存在免疫细胞的许多组织。染色呈现细胞质模式。非特异性结合细胞表面上的除CCR8以外的目标的Ab(诸如16B13)尽管可呈现其他合乎需要的功能特性,但其不适用于靶向表达CCR8的细胞以进行消耗的治疗用途。

[0119] 因此,本发明提供一种抗CCR8 mAb或其抗原结合部分,其特异性结合表达CCR8的细胞(诸如肿瘤Treg)以及胸腺的髓质及皮肤的真皮中的稀少及分散的免疫细胞,但不与多种人类组织(包括大脑、小脑、心脏、肝脏、肺、肾脏、扁桃体、脾、胸腺、结肠、胃、胰腺、肾上腺、垂体、皮肤、外周神经、睾丸或子宫组织,或PBMC)结合。举例而言,抗CCR8 mAb或其抗原结合部分可特异性结合肿瘤浸润性Treg,但不结合PBMC,例如,在固定的PBMC中不呈现细胞质染色。举例而言,可通过例如在固定的组织样品上用相关Ab进行标准染色(例如,通过实施例14中描述的方法)来确定Ab不与上述列表中的细胞及组织结合。

[0120] 通过抗CCR8 MAb抑制CCR8/配体信号传导

在实施例15及16中,通过对表达CCR8的CH0细胞株进行钙(ca)通测量定法来测试抗CCR8 mAb对分别结合hCCR8及mCCR8的hCCL1及mCCL1的阻断以及CCR8/CCL1信号传导的阻断,因为CH0细胞上的CCR8的CCL1接合诱导Ca通量。CCL1为唯一的已知结合CCR8的配体。研究表明,结合CCR8的CCL1可在在体外测定法中增强Treg抑制以及在小鼠模型中抑制自身免

疫发炎反应(Barsheshet等人,2017)。阻断性抗CCR8 Ab在SA1N纤维肉瘤模型中亦显示部分抗肿瘤功效(图28A)。因此,在本发明的某些实施方案中,本发明的抗CCR8 Ab或其抗原结合部分抑制CCL1与CCR8(例如,hCCR8或mCCR8)的结合,且抑制CCR8/CCL1信号传导。在优选的实施方案中,分别如实施例15及16中关于hCCR8及mCCR8所描述来测量Ca通量的抑制。

[0121] 在某些实施方案中,抗hCCR8 mAb以约10nM或更低;约5nM或更低;优选约1nM或更低;更优选约0.5nM或更低;更优选约0.1nM或更低;甚至更优选约0.01nM或更低的 IC_{50} 抑制CCR8/CCL1信号传导。在某些优选的实施方案中,抗hCCR8 mAb以约0.5nM的 IC_{50} 抑制CCR8/CCL1信号传导。在某些实施方案中,抗hCCR8 Ab以约0.01nM与约10nM之间的 IC_{50} 抑制CCR8/CCL1信号传导。在某些其他实施方案中,抗hCCR8 Ab以约0.05nM与约5nM之间的 IC_{50} 抑制CCR8/CCL1信号传导。在某些优选的实施方案中,抗hCCR8 Ab以约0.1nM与约1nM之间的 IC_{50} 抑制CCR8/CCL1信号传导。在更优选实施方案中,抗hCCR8 Ab以约0.2nM与约0.5nM之间的 IC_{50} 抑制CCR8/CCL1信号传导。这些 IC_{50} 值系基于实施例15中描述的测定法。

[0122] 由抗CCR8 MAbs进行的ADCC介导的表达CCR8的细胞的杀伤

通过测量抗hCCR8及抗mCCR8 mAb诱导表达Fc受体的人类或小鼠报道细胞的交联的能力来间接地评估其诱导ADCC介导的表达CCR8的细胞的杀伤的能力。在某些实施方案中,本发明的mAb或其抗原结合部分以某一 EC_{50} 介导表达CCR8的细胞的消耗,如通过CD16交联测定法所测量。在优选的实施方案中,通过实施例17及18中分别关于hCCR8及mCCR8所描述的交联测定法来测量ADCC潜力。

[0123] 在某些实施方案中,抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分以约100pM或更低,优选约30pM或更低,优选约10pM或更低,优选约3pM或更低,更优选约1pM或更低,更优选约0.5pM或更低,更优选约0.1pM或更低,或甚至更优选约0.05pM或更低的 EC_{50} 介导表达CCR8的细胞的消耗,如通过CD16交联测定法所测量。在某些优选的实施方案中,抗hCCR8 mAb以约0.7pM的 EC_{50} 介导表达CCR8的细胞的消耗。在某些实施方案中,抗hCCR8 Ab以约0.05pM与约50pM之间,优选约0.1pM与约10nM之间,更优选约0.3nM与约7nM之间且甚至更优选约0.6nM与约3nM之间的 EC_{50} 介导表达CCR8的细胞的消耗。这些 EC_{50} 值系基于实施例17中描述的CD16交联测定法。

[0124] 在实施例19及20中证明经活化的Treg及患者肿瘤Treg的直接杀伤。在某些实施方案中,抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分以约500pM或更低,优选约100pM或更低,优选约30pM或更低,更优选约15pM或更低,甚至更优选约5pM或更低,或更优选约1pM或更低的 EC_{50} 介导经活化的Treg的消耗,如通过细胞凋亡测定法所测量。在某些优选的实施方案中,抗hCCR8 mAb以约13pM的 EC_{50} 介导表达CCR8的细胞的消耗。在某些实施方案中,抗hCCR8 mAb以约1pM与约500pM之间,优选约5pM与约100pM之间且更优选约10pM与约50pM之间的 EC_{50} 介导表达CCR8的细胞的消耗。这些 EC_{50} 值系基于实施例19中描述的细胞凋亡测定法。

[0125] 抗CCR8 mAb未引起CCR8的内化

对某些细胞表面受体具有特异性的Ab经由受体介导的内饮作用来诱导受体的内化,内化可能为用于治疗性应用的某些药物、毒素或酶的靶向递送所必需的。如图19中所示,抗可诱导型T细胞共刺激剂(ICOS)mAb在不存在交联Ab的情况下不引起ICOS受体的内化,但在存在交联Ab的情况下引起显著的ICOS内化。相比之下,抗CCR8 mAb在存在或不存在交联Ab的情况下皆不引起CCR8的内化。由于自Treg细胞表面移除受体,由抗CCR8 Ab引起的

CCR8的内化将降低其介导Treg消耗的能力。因此,不存在由抗CCR8 Ab引起的CCR8内化进一步证实这些Ab的治疗潜力。可通过本领域使用的标准技术,例如实施例21中的实验方案来测量CCR8内化。

[0126] 因此,本发明提供抗CCR8 mAb或其抗原结合部分,其在存在或不存在交联Ab的情况下,在结合细胞表面上的CCR8时不引起CCR8的内化。在某些优选的实施方案中,在细胞表面上表达CCR8的细胞为Treg。

[0127] 在体外及离体患者肿瘤样品中的人类肿瘤Treg的消耗

在在体外系统中评估抗hCCR8 mAb介导肿瘤Treg的消耗的能力,其中将经消化的患者肿瘤与同种异体NK细胞共同培养(实施例22)。证实抗hCCR8 mAb,即4A19,诱导肿瘤Treg的消耗而不减少Teff的群体。在此在体外测定法系统中,mAb 4A19在Treg消耗方面比抗CCR4-nf mAb更有效(图20A)且不诱导CD4⁺效应T细胞的消耗,而抗CCR4-nf Ab以可测量方式引起这些细胞的消耗(图20B)。抗CCR8及抗CCR4皆不消耗CD8⁺效应T细胞(图20C)。

[0128] 亦使用经切片的患者肿瘤在离体测定法系统中评估抗hCCR8 mAb诱导肿瘤Treg的消耗的能力(实施例20)。证实mAb 16B13-IgG1-nf在不添加同种异体NK细胞的情况下介导Treg消耗(图18H及18I)。

[0129] 在某些实施方案中,本发明的抗CCR8 mAb或其抗原结合部分在体外诱导肿瘤Treg的消耗而不减少CD4⁺或CD8⁺效应T细胞的群体。在优选的实施方案中,使用实施例22中描述的测定法测量在体外肿瘤Treg的消耗。

[0130] 在某些其他实施方案中,本发明的抗CCR8 mAb或其抗原结合部分诱导离体患者肿瘤组织样品中的肿瘤Treg的消耗。在某些优选的实施方案中,使用实施例20中描述的测定法来测量离体患者肿瘤组织样品中的肿瘤Treg的消耗。

[0131] 抗mCCR8特异性介导的肿瘤Treg的消耗,且不介导正常组织样品中的CCR8T细胞的消耗

除肿瘤Treg以外,CCR8亦在胸腺T细胞的小型子集以及皮肤驻留T细胞(其系在皮肤中发现的稀少群体)上表达。在呈现与人类极类似的CCR8表达概况的CT26小鼠同基因型肿瘤模型中,抗mCCR8消耗性mAb,即抗CCR8-mIgG2a,选择性地消耗肿瘤中的CCR8⁺ Treg,但不消耗皮肤、胸腺、脾或血液中的CCR8⁺ T细胞(实施例24)。抗CCR8-mIgG2a在肿瘤但非其他表达CCR8的器官中的高特异性消耗活性可归因于Ab结合的目标细胞附近的Fc γ RIV表达细胞的相对较低出现率或皮肤、胸腺、脾及血液中的CCR8⁺ T细胞上的较低CCR8表面密度。此有力地支持以下观点:对活化性Fc γ R具有优化亲和力的抗CCR8 Ab(诸如人类或人源化IgG1-nf抗CCR8 mAb,如4A19或14S15)将实现人类患者中的强效肿瘤Treg消耗而不会无意地消耗CD16表达较低的皮肤中的CCR8⁺ T细胞。

[0132] 在所公开的本发明的某些实施方案中,抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分特异性诱导肿瘤Treg的消耗而不消耗皮肤、胸腺、脾及血液中的CCR8⁺ T细胞。在某些优选的实施方案中,使用实施例24中描述的测定法测量活体内肿瘤Treg的消耗。

[0133] 抗CCR8 MAbs与参考Ab结合相同CCR8表位

本发明还提供分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其与参考Ab结合hCCR8的相同表位,其中参考Ab包含:

(a) V_H,其包含具有如SEQ ID NO:3所示序列的连续连接的氨基酸,及V_L,其包含具

有如SEQ ID NO:15所示序列的连续连接的氨基酸；

(b) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸；

(c) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:5所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:17所示序列的连续连接的氨基酸；

(d) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸；

(e) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:7所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:19所示序列的连续连接的氨基酸；

(f) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:8所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:20所示序列的连续连接的氨基酸；

(g) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:21所示序列的连续连接的氨基酸；

(h) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:10所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:22所示序列的连续连接的氨基酸；

(i) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:11所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:23所示序列的连续连接的氨基酸；

(j) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:12所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:24所示序列的连续连接的氨基酸；

(k) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:13所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:25所示序列的连续连接的氨基酸；

(l) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:14所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:26所示序列的连续连接的氨基酸；或

(m) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸。

[0134] 在某些优选的实施方案中，提供分离的Ab，优选mAb，或其抗原结合部分，其与参考Ab结合hCCR8的相同表位，其中参考Ab包含：

(a) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸；

(b) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:1144所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸；或

(c) V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。

[0135] 在某些优选的实施方案中，提供分离的Ab，优选mAb，或其抗原结合部分，其与参考Ab结合hCCR8的相同表位，其中参考Ab包含 V_H ，其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸，及 V_L ，其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。

[0136] 与参考Ab交叉竞争结合CCR8的抗CCR8 MAbs

所公开的本发明的范畴内亦涵盖分离的Ab，优选mAb，或其抗原结合部分，其特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8且与参考Ab或其参考抗原结合部分交叉竞争结合hCCR8。

Ab对“交叉竞争”结合抗原(例如,CCR8)的能力指示第一Ab与第二Ab结合抗原的实质上相同的表位区域且在空间上阻碍第二Ab与该特定表位区域的结合,及相反地,第二Ab与第一Ab结合抗原的实质上相同的表位区域且在空间上阻碍第一Ab与该表位区域的结合。因此,测试Ab竞争性抑制例如mAb 14S15或4A19与hCCR8的结合的能力表明测试Ab与mAb 14S15或4A19结合hCCR8的实质上相同的表位区域。

[0137] 若第一Ab使第二Ab与抗原的结合减少达至少约40%,则认为第一Ab与第二Ab结合“实质上相同的表位”。优选地,第一Ab使第二Ab与抗原的结合减少超过约50%(例如,至少约60%或至少约70%)。在更优选实施方案中,第一Ab使第二Ab与抗原的结合减少超过约70%(例如,至少约80%、至少约90%或约100%)。第一及第二Ab的顺序可颠倒,亦即,“第二”Ab可首先结合表面且“第一”Ab随后在存在“第二”Ab的情况下与表面接触。若在与Ab添加至固定抗原中的顺序无关的情况下观测到与抗原的结合的竞争性减少,则认为该等Ab“交叉竞争”。

[0138] 预期交叉竞争Ab具有与参考Ab的特性极类似的功能特性,因为其结合抗原(诸如CCR8受体)的实质上相同的表位区域。交叉竞争的程度越高,功能特性的相似性将越高。举例而言,若两种交叉竞争性Ab各自抑制其中另一者与表位的结合达至少约80%,则预期其具有基本上相同的功能特性。若交叉竞争性Ab呈现类似的对表位的结合亲和力(如通过解离常数(K_D)所测量),则预期此功能相似性将甚至更紧密。

[0139] 使用重组抗原分子或细胞表面表达的抗原分子,交叉竞争性抗抗原Ab可基于其在标准抗原结合测定法中的以可侦测方式竞争的能力而容易地鉴定,包括BIACORE®分析、ELISA测定法或流式细胞术。作为实例,简单的用于鉴定测试Ab是否与mAb 4A19竞争结合hCCR8的竞争测定法可涉及:(1)测量在饱和浓度下施用的4A19与上面固定有hCCR8的BIACORE®芯片(或其他适用于SPR分析的培养基)的结合,及(2)测量4A19与经hCCR8涂布的BIACORE®芯片(或其他适合的培养基)的结合,该芯片先前已与测试Ab结合。比较在存在及不存在测试Ab的情况下,4A19与经hCCR8-1涂布的表面的结合。在存在测试Ab的情况下4A19的结合的显著(例如,超过约40%)减少指示两种Ab识别实质上相同的表位,使得其竞争结合hCCR8目标。第二Ab抑制第一Ab与抗原的结合的百分比可计算为:[1-(在存在第二Ab的情况下所侦测的第一Ab的结合)/(不存在第二Ab的情况下所侦测的第一Ab的结合)]×100。为了测定Ab是否交叉竞争,除了测量在存在4A19的情况下测试Ab与经hCCR8涂布的芯片的结合以外,重复竞争性结合测定法。

[0140] 本文中所公开的任何抗CCR8 Ab皆可充当交叉竞争测定法中的参考Ab。在某些实施方案中,参考Ab包含:

(a) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:3所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:15所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸;

(c) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:5所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:17所示序列的连续连接的氨基酸;

(d) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸;

(e) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:7所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:19所示序列的连续连接的氨基酸;

(f) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:8所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:20所示序列的连续连接的氨基酸;

(g) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:21所示序列的连续连接的氨基酸;

(h) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:10所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:22所示序列的连续连接的氨基酸;

(i) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:11所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:23所示序列的连续连接的氨基酸;

(j) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:12所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:24所示序列的连续连接的氨基酸;

(k) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:13所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:25所示序列的连续连接的氨基酸;

(l) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:14所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:26所示序列的连续连接的氨基酸;或

(m) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸。

[0141] 在某些优选的实施方案中, 参考Ab包含:

(a) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:1144所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸;或

(c) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。

[0142] 在某些优选的实施方案中, 参考Ab包含 V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。

[0143] 结构上定义的抗CCR8 MAb

本发明还提供分离的Ab, 优选mAb, 或其抗原结合部分, 其特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8且包含以下中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3结构域:

(a) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:3所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:15所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸;

(c) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:5所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:17所示序列的连续连接的氨基酸;

(d) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸;

(e) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:7所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具

有如SEQ ID NO:19所示序列的连续连接的氨基酸;

(f) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:8所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:20所示序列的连续连接的氨基酸;

(g) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:21所示序列的连续连接的氨基酸;

(h) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:10所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:22所示序列的连续连接的氨基酸;

(i) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:11所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:23所示序列的连续连接的氨基酸;

(j) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:12所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:24所示序列的连续连接的氨基酸;

(k) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:13所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:25所示序列的连续连接的氨基酸;

(l) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:14所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:26所示序列的连续连接的氨基酸;或

(m) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸。

[0144] 优选为分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8且包含以下中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3:

(a) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:1144所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸;或

(c) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。

[0145] 优选为分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8且包含以下中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3结构域: V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸;及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。

[0146] 已研发不同的用于划定Ab内的CDR结构域的方法。Kabat及其同事的方法(Wu及Kabat,1970;Kabat等人,1983)系基于以下假设:CDR包括Ab中的可变性最高的位置且因此可通过比对极有限数目的可用的Ab序列来鉴定。基于此比对,Kabat等人引入用于高变区中的残基的编号方案且确定标记各CDR的开端及末端的位置(<http://bioinf.org.uk/abs/simkab.html>)。

[0147] 除广泛使用的Kabat定义以外,已使用其他定义,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;参见AbNum;可在<http://www.bioinf.org.uk/abs/abnum/>获得)、AbM(<http://www.bioinf.org.uk/abs/>;Martin等人,1989)、接触式(<http://bioinf.org.uk/abs/>;MacCallum等人,1996)及IMGT(Lefranc等人,2003;<http://>

www.imgt.org) 定义,其寻求解决Kabat定义的缺陷。尽管在未能获得关于Ab的结构信息时研发,但Kabat定义系最常用的用于预测CDR结构域的方法。

[0148] 在未明确陈述时且除非上下文另有指示,否则使用Kabat定义鉴定本文中所公开的CDR。使用Kabat方法定义的6个CDR结构域的氨基酸序列以及mAb 16B13、14S15、14S15h、18Y12、4A19、2M18、15C17、13T20、10R3、8D55、1V11、11K16及12F27的V_H、V_L、重链及轻链的氨基酸序列展示于表10中。

[0149] 本发明提供分离的Ab,优选mAb,其包含如由Kabat方法定义的以下CDR结构域:

(a) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:27所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:28所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:29所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:30所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:31所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:32所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:33所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:34所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:35所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:36所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:37所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:38所示序列的连续连接的氨基酸;

(c) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:39所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:40所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:41所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:42所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:43所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:44所示序列的连续连接的氨基酸;

(d) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:45所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:46所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:47所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:48所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:49所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:50所示序列的连续连接的氨基酸;

(e) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:51所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:52所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:53所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:54所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:55所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:56所示序列的连续连接的氨基酸;

(f) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:57所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:58所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区

所示序列的连续连接的氨基酸;或

(m) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:103所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:104所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:105所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:106所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:107所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:108所示序列的连续连接的氨基酸。

[0150] 优选分离的Ab,优选mAb,包含如由Kabat方法定义的以下CDR结构域:

(a) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:33所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:34所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:35所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:36所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:37所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:38所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:103所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:104所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:105所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:106所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:107所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:108所示序列的连续连接的氨基酸;或

(c) 重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:45所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:46所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:47所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:48所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:49所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:50所示序列的连续连接的氨基酸。

[0151] 在某些优选的实施方案中,分离的Ab,优选mAb,包含如由Kabat方法定义的以下CDR结构域:重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:45所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:46所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:47所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:48所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:49所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:50所示序列的连续连接的氨基酸。

[0152] 所公开的本发明亦涵盖分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8,其中分离的Ab或其抗原结合部分包含:

(a) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:3所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:15所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸;

(c) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:5所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:17所示序列的连续连接的氨基酸;

(d) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸;

(e) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:7所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:19所示序列的连续连接的氨基酸;

(f) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:8所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:20所示序列的连续连接的氨基酸;

(g) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:9所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:21所示序列的连续连接的氨基酸;

(h) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:10所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:22所示序列的连续连接的氨基酸;

(i) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:11所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:23所示序列的连续连接的氨基酸;

(j) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:12所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:24所示序列的连续连接的氨基酸;

(k) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:13所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:25所示序列的连续连接的氨基酸;

(l) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:14所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:26所示序列的连续连接的氨基酸;或

(m) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸。

[0153] 优选分离的Ab, 优选mAb, 或其抗原结合部分, 特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8且包含:

(a) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸;或

(c) V_H , 其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。

[0154] 优选分离的Ab, 优选mAb, 或其抗原结合部分特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8且包含 V_H , 其包含如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸, 及 V_L , 其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。

[0155] 包含具有与以上抗CCR8 Ab中的任一者的氨基酸序列高度类似或同源的氨基酸序列的 V_H 及 V_L 区域且保留这些Ab的功能特性的抗CCR8 Ab亦适用于本发明的方法。举例而言, 适合的Ab包括mAb, 其包含有各自包含连续连接的氨基酸的 V_H 和/或 V_L 区域, 该等连续连接的氨基酸具有分别与SEQ ID NO.6和/或18中所示的氨基酸序列至少80%一致的序列。举例而言, 在其他实施方案中, V_H 和/或 V_L 氨基酸序列分别与SEQ ID NO.6和/或18中所示序列呈现至少85%、90%、95%或99%一致性。如本文中所使用, 两个氨基酸序列之间的序列一致性

百分比为由序列共有的一致位置的数目与所比较的序列的长度的函数(亦即,一致性百分比=一致位置的数目/所比较的位置的总数 $\times 100$),考虑所引入的用于最大化两个序列之间的序列一致性程度的任何空位的数目及每个此类空位的长度。可使用一般本领域技术人员熟知的数学算法实现序列的比较及两个序列之间的一致性百分比的测定。

[0156] 当公开包含具有与以上抗CCR8 Ab中的任一者的氨基酸序列高度类似或同源的氨基酸序列的 V_H 及 V_L 区域且保留这些Ab的功能特性的抗CCR8 Ab时,其可在至少1、2、3、4、5或全部6个CDR内具有100%一致性且与相关完全 V_H 和/或 V_L 序列具有至少85%、90%、95%或99%一致性。

[0157] 举例而言,特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8的分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分可包含:

(a) V_H ,其包含具有与如SEQ ID NO:4所示序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有与如SEQ ID NO:16所示序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列的连续连接的氨基酸,任选其中 V_H 包含如关于SEQ ID NO:4所定义的CDR中的至少1、2或全部3者(SEQ ID NO 33-35)且 V_L 包含如关于SEQ ID NO:16所定义的CDR中的至少1、2或全部3者(SEQ ID NO 36-38);

(b) V_H ,其包含具有与如SEQ ID NO:115所示序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有与如SEQ ID NO:116所示序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列的连续连接的氨基酸,任选其中 V_H 包含如关于SEQ ID NO:115所定义的CDR中的至少1、2或全部3者(SEQ ID NO.103-105)且 V_L 包含如关于SEQ ID NO:116所定义的CDR中的至少1、2或全部3者(SEQ ID NO.106-108);或

(c) V_H ,其包含具有与如SEQ ID NO:6所示序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有与如SEQ ID NO:18所示序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列的连续连接的氨基酸,任选其中 V_H 包含如关于SEQ ID NO:6所定义的CDR中的至少1、2或全部3者(SEQ ID NO.45-47)且 V_L 包含如关于SEQ ID NO:18所定义的CDR中的至少1、2或全部3者(SEQ ID NO.48-50)。

[0158] 类似地,对于本文中提及的其他分离的Ab中的任一者,Ab可包含 V_H ,其包含具有与参考 V_H 序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有与参考 V_H 序列至少85%、90%、95%或99%一致的序列的连续连接的氨基酸,任选其中 V_H 包含如关于参考 V_H 序列所定义的CDR中的至少1、2或全部3者且 V_L 包含如关于参考 V_L 序列所定义的CDR中的至少1、2或全部3者。

[0159] 本发明亦涵盖分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其任选特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8,其中分离的Ab或其抗原结合部分包含:

(a) 重链,其包含具有如SEQ ID NO:99所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:111所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) 重链,其包含具有如SEQ ID NO:100所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:112所示序列的连续连接的氨基酸;

(c) 重链,其包含具有如SEQ ID NO:101所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:113所示序列的连续连接的氨基酸;

(d) 重链,其包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其

包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸；

(e) 重链,其包含具有如SEQ ID NO:117所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:118所示序列的连续连接的氨基酸;或

(f) 重链,其包含具有如SEQ ID NO:110所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:119所示序列的连续连接的氨基酸。

[0160] 优选为分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其任选特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8,其中分离的Ab或其抗原结合部分包含:

(a) 重链,其包含具有如SEQ ID NO:100所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:112所示序列的连续连接的氨基酸;

(b) 重链,其包含具有如SEQ ID NO:117所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:118所示序列的连续连接的氨基酸;或

(c) 重链,其包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸。

优选为分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其任选特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8,其中分离的Ab或其抗原结合部分包含:

(a) 重链,其包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸。

[0161] 在某些实施方案中,本发明的经分离的抗CCR8 Ab或其抗原结合部分为人Ab或其片段。在其他实施方案中,其为人源化Ab或其片段。在其他实施方案中,其为嵌合Ab或其片段。在其他实施方案中,经分离的抗CCR8 Ab或其抗原结合部分为小鼠Ab或其片段。对于人类个体的给药,Ab优选为嵌合Ab或更优选为人源化或人Ab。此类嵌合、人源化、人类或小鼠mAb可通过本领域熟知的方法制备及分离。

[0162] 除全长Ab以外,本文中所公开的抗CCR8 Ab亦包括能够介导ADCC的抗原结合片段。

[0163] 抗CCR8免疫偶联物(Immunoconjugate)

在另一方面中,本发明涉及连接至细胞溶解剂(诸如细胞毒素或放射性同位素)的本文中所公开的经分离的抗hCCR8 Ab中的任一者或其抗原结合部分。此类结合物在本文中称为“免疫偶联物”。使用在本领域可用的连接符技术使细胞毒素与本发明的Ab结合。本领域已建立用于制备放射免疫偶联物的方法。

[0164] 双特异性分子

在另一方面中,本发明涉及双特异性分子,其包含连接至结合域的本文中所公开的经分离的抗hCCR8 mAb中的任一者或其抗原结合部分,该结合域具有与抗hCCR8 mAb或其抗原结合部分不同的结合特异性。结合域可为功能性分子,例如,另一种Ab、Ab的抗原结合部分或受体的配体,使得所产生的双特异性分子结合至少两个不同的结合位点或目标分子。

[0165] 编码抗hCCR8 MAb的核酸及用于表达Ab的用途

本发明的另一方面涉及编码本发明的经分离的抗hCCR8 Ab中的任一者的核酸。本发明提供编码本文中所描述的抗CCR8 mAb中的任一者或其抗原结合部分的经分离的核酸。

[0166] “经分离的”核酸系指物质的核酸组合物,其与天然存在的核酸明显不同,亦即,具有独特的化学一致性、性质及效用。举例而言,与原生DNA不同,经分离的DNA为原生DNA的独

立部分且不为在自然界中发现的较大的结构性复合物(染色体)的整体部分。此外,与原生DNA不同,经分离的DNA可用作PCR引子或杂交探针,以尤其用于测量基因表达及检测生物标志物基因或突变,以用于诊断疾病或预测治疗剂的功效。亦可使用本领域熟知的标准技术纯化经分离的核酸,以实质上不含其他细胞组分或其他污染物,例如其他细胞核酸或蛋白质。

[0167] 本发明的核酸可使用标准分子生物学技术获得。对于由杂交瘤(例如,由携带人Ig基因的转基因小鼠制备的杂交瘤,如实施例8中所描述)表达的Ab,可通过标准PCR扩增技术获得编码由杂交瘤产生的Ab的轻链及重链或可变区的cDNA。在获得编码 V_H 及 V_L 区段的DNA片段后,这些DNA片段可使用标准重组DNA技术进一步操作,例如以将可变区DNA转化成全长Ab链基因、Fab片段基因或scFv基因。对于由Ig基因库获得的Ab(例如,使用噬菌体呈现技术),可自该库回收编码Ab的核酸。

[0168] 本发明的核酸可为例如RNA或DNA,诸如cDNA或基因体DNA。在优选的实施方案中,核酸为cDNA。

[0169] 本发明还提供包含经分离的核酸的表达载体,该经分离的核酸编码抗CCR8 mAb或其抗原结合部分。本发明进一步提供包含该表达载体的宿主细胞。优选真核细胞且最佳哺乳动物宿主细胞作为用于表达Ab的宿主细胞,因为此类真核细胞且特定地,哺乳动物细胞,比原核细胞更有可能组装及分泌适当折叠且免疫活性Ab。用于表达本发明的重组Ab的优选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary;CHO)细胞(Kaufman及Sharp,1982)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞及SP2细胞。

[0170] 宿主细胞可用于制备抗CCR8 mAb或其抗原结合部分的方法中,该方法包含在宿主细胞中表达mAb或其抗原结合部分及自宿主细胞分离mAb或其抗原结合部分。宿主细胞可离体或活体内使用。可将编码Ab重链及轻链的DNA插入单独的表达载体中或更典型地,皆插入同一载体中。通过将编码Ab的 V_H 及 V_L 区段的DNA插入已编码所需同型的重链及轻链恒定区的表达载体,使得 V_H 区段以可操作的方式连接至载体内的 C_H 区段且 V_L 区段以可操作的方式连接至载体内的 C_L 区段,可使用这些可变区建立任何同型的全长Ab。不具有 α -(1,6)岩藻糖基转移酶(FUT8)酶的细胞株可用于产生在碳水化合物中不具有岩藻糖的mAb(参见例如,美国公开第2004/0110704号;Yamane-Ohnuki等人,2004;EP 1176195)。

[0171] 本发明的另一方面涉及包含人Ig重链及轻链转基因的转基因小鼠,其中小鼠表达本文中所公开的抗CCR8HuMAb中的任一者。本发明亦涵盖由该小鼠制备的杂交瘤,其中该杂交瘤产生HuMAb。

[0172] 治疗性抗CCR8方法

因为在本发明的研究中产生的抗hCCR8 Ab不结合mCCR8,使用小鼠抗mCCR8 mAb作为人类或人源化 μ IgG1抗hCCR8 mAb的替代物以测试抗CCR8作为抗癌药在小鼠肿瘤模型中的功效。适当Ab同型的选择可用于增强小鼠中的CCR8介导的通过ADCC/ADCP进行的肿瘤Treg消耗,已证明此消耗主要由Ab与鼠类肿瘤中富含的Fc γ RIV⁺细胞(Nimmerjahn等人,2010)的相互作用驱动(Simpson等人,2013)。使用具有小鼠IgG2a同型的抗mCCR8 mAb(称为抗CCR8-mIgG2a)作为将可能用作人类治疗剂的人源化或人类抗hCCR8 mAb的替代物。抗CCR8-mIgG2a系来源于由BioLegend以克隆SA214G2出售的市售大鼠抗mCCR8 mAb,其经修饰以将大鼠IgG2b同型变为小鼠IgG2a同型。与人类抗hCCR8 mAb,即A419及14S15类似,抗

CCR8-mIgG2a为N端结合物且其mIgG2a主链提供最大Fc γ R结合,以用于驱动与人类nf格式类似的ADCC反应。

[0173] 证明抗CCR8-mIgG2a具有与所测试的若干抗hCCR8 mAb的高ADCC潜力(实施例17)类似的高ADCC潜力(实施例18),且阻断mCCL1与表达mCCR8的细胞的结合(实施例16),但其效能低于所测试的若干抗hCCR8 mAb阻断hCCL1与表达hCCR8的细胞的结合(实施例15)。抗hCCR8 mAb亦呈现强效ADCC活性(实施例19及20)。与某些所公开的抗hCCR8mAb相比,抗CCR8-mIgG2a亦以较低亲和力结合表达mCCR8的细胞(实施例13)。此表明在指导关于小鼠模型中的肿瘤生长的抑制的研究方面,抗CCR8-mIgG2a为抗hCCR8 mAb的适合的替代物,但抗hCCR8 Ab可能由于其对其同源hCCR8目标的较高结合亲和力、在阻断CCL1配体与CCR8的结合方面的较高活性及较高ADCC潜力而更强效地抑制人类个体中的肿瘤生长。

[0174] 使用各种同基因型小鼠肿瘤模型测定抗CCR8-mIgG2a小鼠替代物(即单独的mAb及与抗PD-1的组合)的抗肿瘤活性。抗CCR8-mIgG2a mAb(在免疫原性小鼠肿瘤模型中以单一试剂形式,包括CT26及MC38结肠腺癌模型及SA1N纤维肉瘤模型,参见实施例23-26及29,且在免疫疗法抗性模型MB49及4T1中以与抗PD-1的组合形式)介导的Treg消耗及连续促炎性反应(CD8、CD4、干扰素- γ 、颗粒酶B及Ki67的增加)诱导稳定的肿瘤生长抑制及高百分比的完成肿瘤清除。相比之下,用CCR8-mIgG1-D265A,一种包含Fc惰性mIgG1-D265A重链的变异型Ab(Baudino等人,2008),进行的治疗对肿瘤消退的作用最小(实施例29及30)。为了测定在抗CCR8 Ab治疗后,Treg消耗与肿瘤功效之间是否存在剂量依赖性关系,在MC38模型中进行单次剂量单药疗法研究且观测到剂量依赖性药物动力学/药效学/功效关系(实施例26)。此外,在消耗时观测到肿瘤上清液中的增加及可滴定的CCL1配体变化(资料未展示),其可充当替代性生物标志物。

[0175] 在MB49小鼠膀胱癌中,抗CCR8-mIgG2a仅展示部分抗肿瘤活性,但仍比抗PD-1 mAb的活性强(实施例27)。类似地,在4T1小鼠乳腺癌模型中,抗CCR8-mIgG2a亦仅展示部分抗肿瘤活性,但此肿瘤对用抗PD-1 mAb进行治疗具有完全抗性(实施例28)。在两种肿瘤模型中,抗CCR8-mIgG2a增强由抗PD-1诱导的免疫反应,引起抗肿瘤反应的效能的显著增加。两种Ab的组合以协同方式强效抑制这些顽固性肿瘤模型中的肿瘤生长。在本文中,若Ab的组合的抗肿瘤功效大于由各Ab个别地呈现的抗肿瘤功效的总和,则认为这些Ab以协同方式相互作用。

[0176] 在用14S15、16B13及4A19 mAb进行治疗时,亦在人类肿瘤外植体模型中证明肿瘤Treg特异性消耗(实施例20)。

[0177] 以单药疗法形式使用抗CCR8 mAb来治疗癌症

本文中所提供的数据说明抗hCCR8 mAb的产生,该抗hCCR8 mAb以高亲和力(EC_{50} = 约0.1-2nM;实施例11)结合经活化的Treg的表面上的hCCR8、在原发性经活化的人Treg与同种异体活化NK细胞共同培养的在体外系统中诱导经由ADCC进行的Treg的强效杀伤(EC_{50} = 约10-60pM;实施例19)且在人类肿瘤外植体及小鼠模型中介导CCR8⁺肿瘤浸润性Treg的特异性消耗(实施例20、22及24)。这些mAb在多种免疫原性及免疫疗法抗性小鼠肿瘤模型中呈现稳定的肿瘤生长抑制(实施例23、25、27-29),且资料强力支持CCR8消耗(以单药疗法或与免疫检查点阻断的组合形式)作为用于癌症的新颖免疫疗法的临床评估。

[0178] 因此,如由实施例中提供的数据支持,本发明提供一种用于治疗罹患癌症的个体

的方法,其包含向个体施用治疗有效量的Treg消耗性抗CCR8 Ab(例如,本文中所公开的mAb、免疫偶联物或双特异性分子)中的任一者或包含该等Ab(例如,抗CCR8 mAb、免疫偶联物或双特异性分子)中的任一者的药物组合物,使得该个体得到治疗。

[0179] 本发明还提供一种用于抑制个体中的肿瘤细胞的生长的方法,其包含向个体施用治疗有效量的Treg消耗性抗CCR8 Ab(例如,本文中所公开的mAb、免疫偶联物或双特异性分子)中的任一者,或包含该等抗CCR8 Ab(例如,mAb、免疫偶联物或双特异性分子)中的任一者的药物组合物,使得抑制个体中的肿瘤细胞的生长。

[0180] 用抗CCR8 Ab与另一种抗癌剂的组合治疗癌症

本发明提供一种用于治疗罹患癌症的个体的方法,其包含向个体施用治疗有效量的:(a)本文中所公开的Treg消耗性抗CCR8 Ab、免疫偶联物或双特异性分子中的任一者,或包含该等抗CCR8 Ab、免疫偶联物或双特异性分子中的任一者的药物组合物;及(b)其他用于治疗癌症的治疗剂,任选其中该其他治疗剂为降低免疫系统的抑制或增加免疫系统的刺激的化合物,使得个体得到治疗。

[0181] 本发明还提供一种用于抑制个体中的肿瘤细胞的生长的方法,其包含向个体施用治疗有效量的:(a)本文中所公开的Treg消耗性抗CCR8 Ab、免疫偶联物或双特异性分子中的任一者,或包含该等抗CCR8 Ab、免疫偶联物或双特异性分子中的任一者的药物组合物;及(b)其他用于治疗癌症的治疗剂。在某些优选的实施方案中,其他治疗剂为降低免疫系统的抑制或增加免疫系统的刺激的化合物,使得抑制个体中的肿瘤细胞的生长。

[0182] 在本发明的方法中的任一者的其他优选的实施方案中,个体为人类患者。

[0183] Treg介导的免疫抑制可能系免疫肿瘤学中的最佳抗肿瘤免疫反应的主要障碍。由癌症免疫疗法靶向的许多分子(诸如PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3及TIGIT)在Treg上被上调(Kumar等人,2018)。因此,这些基于T细胞的免疫疗法亦具有增强Treg反应的可能性。举例而言,PD-1阻断可增强Treg抑制及增加Treg增殖(Kamada等人,2019),且存在临床上在抗CTLA-4疗法之后发生Treg扩增的证据(Kavanagh等人,2008)。因此,Treg消耗性药剂不仅以单药疗法形式改良抗肿瘤反应,且亦增强如本文中所公开的其他免疫疗法的活性(参见实施例27及28)。因此,本发明提供一种用于增强罹患癌症的个体中的由治疗剂引发的抗肿瘤免疫反应的方法,其中治疗剂为免疫治疗剂,诸如癌症免疫疗法,诸如特异性结合PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3或TIGIT的抗体。

[0184] 在小鼠肿瘤模型中,在用抗CCR8-mIgG2a及抗PD-1处理的小鼠中观测到强效组合性抗肿瘤活性(实施例27及28)。尽管在抗CCR8单药疗法及组合治疗的情况下存在CD8⁺ T细胞出现率的类似增加,可能仍需要抗PD-1以增强效应子功能性。此外,已证明抗CCR8治疗引起长期的抗原特异性CD8⁺ T细胞记忆(实施例31)。这些结果对于治疗晚期癌症具有重要的临床意义,该等晚期癌症通常对抗PD1/PD-L1疗法具有抗性(Jenkins等人,2018)且具有高复发率(Mahvi等人,2018)。总体而言,这些研究强调肿瘤Treg上的CCR8的特异性及可靶向性,且支持在晚期实体肿瘤的治疗中评估呈单药疗法或与另一种免疫疗法(诸如抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4)的组合形式的抗CCR8消耗性Ab。

[0185] 在所公开的方法的某些实施方案中,其他治疗剂为降低免疫系统的抑制的化合物。举例而言,其他治疗剂可为小分子化合物、巨环肽、融合蛋白或Ab,例如mAb。在其他实施方案中,其他治疗剂为拮抗剂,诸如拮抗性mAb,其特异性结合程序性死亡-1(PD-1)、程序性

死亡配体-1 (PD-L1)、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4)、淋巴细胞活化基因-3 (LAG-3)、B及T淋巴细胞衰减因子 (BTLA)、T细胞免疫球蛋白及黏蛋白域-3 (TIM-3)、杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR)、杀伤细胞凝集素样受体G1 (KLRG-1)、腺苷A2A受体 (A2aR)、具有Ig及ITIM域的T细胞免疫受体 (TIGIT)、T细胞活化的V结构域Ig抑制因子 (VISTA)、原癌基因酪氨酸-蛋白质激酶MER (MerTK)、自然杀伤细胞受体2B4 (CD244) 或CD160。

[0186] 在某些优选的实施方案中,其他治疗剂为特异性结合PD-1的拮抗性Ab或其抗原结合部分。在其他实施方案中,特异性结合PD-1的Ab系选自纳武单抗 (nivolumab)、派姆单抗 (pembrolizumab)、西米普利单抗 (cemiplimab)、斯巴达珠单抗 (spartalizumab)、卡瑞利珠单抗 (camrelizumab)、信迪利单抗 (sintilimab)、替雷利珠单抗 (tisilelizumab)、特瑞普利单抗 (toripalimab)、多斯利单抗 (dostarlimab)、瑞弗利单抗 (retifanlimab) 及皮米单抗 (pimivalimab),例如选自纳武单抗、派姆单抗、西米普利单抗、斯巴达珠单抗、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗及例如特瑞普利单抗,例如选自纳武单抗及派姆单抗。

[0187] 在其他优选的实施方案中,其他治疗剂为特异性结合PD-L1的拮抗性Ab或其抗原结合部分。在其他实施方案中,特异性结合PD-L1的Ab系选自阿特殊单抗 (atezolizumab)、德瓦鲁单抗 (durvalumab)、艾维路单抗 (avelumab)、恩沃利单抗 (envafolimab)、BMS-936559、CK-301、CS-1001、SHR-1316、CBT-502、BGB-A333及KN035,例如选自阿特殊单抗、德瓦鲁单抗、艾维路单抗、恩沃利单抗、BMS-936559、CK-301、CS-1001、SHR-1316、CBT-502、BGB-A333,例如选自阿特殊单抗、德瓦鲁单抗及艾维路单抗。

[0188] 在其他优选的实施方案中,其他治疗剂为特异性结合CTLA-4的拮抗性Ab或其抗原结合部分。在其他实施方案中,特异性结合CTLA-4的Ab为伊匹单抗 (ipilimumab) 或曲美木单抗 (tremelimumab),例如选自伊匹单抗。

[0189] 本发明还提供一种用于增强罹患癌症的个体中的由治疗剂引发的抗肿瘤免疫反应的方法,其包含向个体施用治疗有效量的本文中所公开的Treg消耗性抗CCR8 Ab、免疫偶联物或双特异性分子中的任一者,或包含该等抗CCR8 Ab、免疫偶联物或双特异性分子中的任一者的药物组合物,使得个体经历比由单独的治疗剂引发的免疫反应更强的针对癌症的免疫反应。在此方法的某些优选的实施方案中,治疗剂为检查点抑制剂,例如抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 mAb。在此方法的某些优选的实施方案中,治疗剂为抗PD-1 Ab纳武单抗。在其他优选的实施方案中,治疗剂为抗PD-1 Ab派姆单抗。在某些优选的实施方案中,治疗剂为抗PD-L1 Ab阿特殊单抗。在其他优选的实施方案中,治疗剂为抗PD-L1 Ab德瓦鲁单抗。在其他优选的实施方案中,治疗剂为抗PD-L1 Ab艾维路单抗。在此方法的某些优选的实施方案中,治疗剂为抗CTLA-4 Ab伊匹单抗。在某些其他实施方案中,治疗剂为放射疗法。

[0190] 可由所公开的方法治疗的癌症

依赖于使用免疫系统的几乎无限制的灵活性来攻击及破坏癌细胞的免疫肿瘤学适用于治疗极广泛范围的癌症(参见例如Yao等人,2013;Callahan等人,2016;Pianko等人,2017;Farkona等人,2016;Kamta等人,2017)。举例而言,已证实抗PD-1 Ab,纳武单抗,可有效治疗多种不同类型的癌症(参见例如Brahmer等人,2015;Guo等人,2017;Pianko等人,2017;WO 2013/173223)且当前正在进行多种实体及血液癌症中的临床试验。因此,所公开的方法(其以单药疗法或与另一种免疫疗法(诸如免疫检查点抑制)的组合形式使用CCR8介导的肿瘤浸润性Treg的消耗)适用于治疗多种实体及液体肿瘤。

[0191] 适于治疗的癌症的广效性

因为本文中所公开的癌症治疗方法中所使用的Ab不直接靶向癌细胞,而改为通过消耗免疫抑制性Treg来靶向及增强免疫系统(任选与免疫检查点抑制组合,其促进免疫系统攻击及破坏癌细胞),所以这些Ab适用于治疗广泛范围的癌症。已说明纳武单抗在治疗不同癌症中的功效,由批准此药物用于治疗晚期黑素瘤、晚期非小细胞肺癌、转移性肾细胞癌、经典霍奇金氏淋巴瘤(classical Hodgkin lymphoma)、头部及颈部的晚期鳞状细胞癌、转移性尿道上皮癌、MSI-H或dMMR转移性结肠直肠癌、肝细胞癌、小细胞肺癌及食道鳞状细胞癌(Drugs.com-Opdivo Approval History: <https://www.drugs.com/history/opdivo.html>)以及正在进行的许多其他癌症中的临床试验证明。类似地,抗PD-L1药物(诸如阿特珠单抗(TECENTRIQ®)、德瓦鲁单抗(IMFINZI®)及艾维路单抗(BAVENCIO®)已在多种适应症中获得批准。因此,可使用抗CCR8 Ab(及任选地,与抗CCR8及抗PD-1/PD-L1 Ab的组合)治疗多种不同癌症。此治疗剂的组合显示的高功效使得能够集中于具有大量未满足的医疗需求的癌症。

[0192] 在某些实施方案中,所公开的癌症疗法方法可广泛地用于治疗实体肿瘤型癌症。举例而言,在某些实施方案中,实体肿瘤为选自以下的癌症:鳞状细胞癌、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、鳞状NSCLC、非鳞状NSCLC、头颈癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胃肠癌、小肠癌、肝癌、肝细胞癌(HCC)、胰腺癌(PAC)、肾癌、肾细胞癌(RCC)、膀胱癌、尿道癌、输尿管癌、结肠直肠癌(CRC)、结肠癌、结肠恶性肿瘤、肛门区癌、子宫内膜癌、前列腺癌、纤维肉瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤、神经胶母细胞瘤、生殖细胞肿瘤、儿童肉瘤、鼻腔鼻窦自然杀伤细胞、黑素瘤、皮肤癌、骨癌、子宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、输卵管癌、卵巢癌、子宫颈恶性肿瘤、阴道癌、外阴癌、睾丸癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、阴茎癌、肾盂恶性肿瘤、中枢神经系统(CNS)的赘瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊椎轴肿瘤、脑癌、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮样癌症、鳞状细胞癌症、儿童实体肿瘤、环境诱导的癌症、病毒相关癌症、病毒性来源癌症、晚期癌症、不可切除性癌症、转移性癌症、难治性癌症、复发性癌症及其任何组合。在某些实施方案中,癌症为晚期、不可切除性、转移性、难治性癌症和/或复发性癌症。

[0193] 基于小鼠模型中的用抗CCR8有效治疗不同癌症的论证(实施例23-29),预期某些肿瘤类型尤其适于用抗CCR8 Ab治疗。因此,在某些实施方案中,实体肿瘤为选自结肠腺癌、膀胱癌、乳腺癌及纤维肉瘤的癌症。抗CCR8在抗PD-1展示极小功效的小鼠模型(诸如MB49膀胱(实施例27)及4T1乳腺癌模型(实施例28))中有效地使肿瘤缩小的结果表明抗CCR8可极广泛地适用于且比抗PD-1更广泛地有效用于治疗癌症,且抗CCR8与检查点阻断剂(例如,抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4)的组合甚至可具有更广泛的用于治疗不同癌症的适用性。

[0194] 对人类肿瘤进行单细胞RNA-seq分析以进行CCR8⁺ Treg的差异性基因表达分析(实施例32)。CCR8及CD8A的相对高表达以及其高CCR8/CD8A比率将头颈部鳞状细胞癌(HNSC)、肺腺癌(LUAD)、胃腺癌(STAD)、肺鳞状细胞癌(LUSC)、胰腺腺癌(PAAD)、直肠腺癌(READ)、食道癌(ESCA)、乳腺侵袭性癌(BRCA)、结肠腺癌(COAD)以及子宫颈鳞状细胞癌及子宫颈内腺癌(CESC)鉴定为预期尤其适于用抗CCR8 Ab治疗的肿瘤类型。因此,在某些实施方案中,实体肿瘤为选自HNSC、LUAD、STAD、LUSC、PAAD、READ、ESCA、BRCA、COAD、CESC、滤泡性淋巴瘤、急性淋巴细胞性白血病及淋巴瘤的癌症,如预期尤其适于用抗CCR8 Ab治疗的肿瘤类

型。

[0195] 在17种肿瘤类型或亚型中通过福尔马林固定、石蜡包埋 (FFPE) 组织样品上的IHC评估,发现CCR8表达在头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC;在本文中也称为头部及颈部的鳞状细胞癌[SCCHN]) 中大量存在且在多形性神经胶质母细胞瘤 (GBM;实施例33) 中最少。基于表达大量CCR8的肿瘤更可能对用抗CCR8 Ab进行的治疗起反应,这些肿瘤分析数据支持HNSCC、子宫颈、CRC、非小细胞肺癌-鳞状细胞癌 (NSCLC-SCC)、NSCLC-腺癌 (NSCLC-ADC)、胰腺、胃、膀胱及乳腺癌对抗CCR8疗法的优先权。因此,在某些实施方案中,实体肿瘤为选自HNSCC、子宫颈、CRC、NSCLC-SCC、NSCLC-ADC、胰腺、胃、膀胱及乳腺癌的癌症。

[0196] 在某些实施方案中,本发明的疗法方法可用于治疗血液恶性肿瘤 (hematological malignancy) 型癌症。血液系统肿瘤包括来源于两种主要血球谱系 (亦即,骨髓细胞株 (其产生粒细胞、红细胞、凝血细胞、巨噬细胞及肥大细胞) 或淋巴细胞株 (其产生B、T、NK及细胞)) 中的任一者的液体肿瘤,包括所有类型的白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。可使用本发明的疗法方法治疗的血液系统肿瘤包括例如选自以下的癌症:急性淋巴母细胞性白血病 (ALL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞性白血病 (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)、多发性骨髓瘤、冒烟型骨髓瘤 (smoldering myeloma)、意义不明单克隆伽玛球蛋白症 (MGUS)、晚期、转移性、难治性和/或复发性血液系统肿瘤以及该等血液系统肿瘤的任何组合。

[0197] TARGET (用于产生有效治疗的治疗学适用性研究 (Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments), <https://ocg.cancer.gov/programs/target>) 分析亦表明,在所检验的血液系统肿瘤中,发现滤泡性淋巴瘤、急性淋巴细胞性白血病及淋巴瘤具有最高的CCR8的相关表达且应优先用抗CCR8 mAb治疗 (实施例32)。因此,在本发明的治疗方法的某些实施方案中,血液恶性肿瘤为滤泡性淋巴瘤或急性淋巴细胞性白血病及淋巴瘤。

[0198] 在某些其他实施方案中,血液恶性肿瘤为选自以下的癌症:急性、慢性、淋巴细胞性 (淋巴母细胞性) 和/或骨髓性白血病,诸如ALL、AML、CLL及CML;淋巴瘤,诸如HL、NHL,其中约85%为B细胞淋巴瘤,包括弥漫性大型B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、滤泡性淋巴瘤 (FL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)/小淋巴细胞性淋巴瘤 (SLL)、套细胞淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤 (黏膜相关淋巴组织 (MALT) 淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤及脾边缘区B细胞淋巴瘤)、伯基特淋巴瘤 (Burkitt lymphoma)、淋巴浆细胞样淋巴瘤 (LPL;亦称为瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症 (Waldenstrom's macroglobulinemia;WM))、毛状细胞淋巴瘤及原发性中枢神经系统 (CNS) 淋巴瘤,T细胞淋巴瘤型NHL,包括前体T淋巴母细胞淋巴瘤/白血病、T-淋巴母细胞淋巴瘤/白血病 (T-Lbly/T-ALL)、外周T细胞淋巴瘤 (诸如皮肤T细胞淋巴瘤 (CTLC,亦即,蕈样霉菌病、塞扎里症候群 (Sezary症候群) 等))、成年人T细胞淋巴瘤/白血病、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤、结外自然杀伤细胞/鼻型T细胞淋巴瘤、肠病相关肠道T细胞淋巴瘤 (EATL)、多形性大细胞淋巴瘤 (ALCL) 及未指定的外周T细胞淋巴瘤、急性骨髓淋巴瘤、淋巴浆细胞样淋巴瘤、单核细胞样B细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、肠道T细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、移植术后淋巴增生性疾病、真实组织细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、弥漫性组织细胞淋巴瘤 (DHL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤及前体B淋巴母细胞淋巴瘤;骨髓瘤,诸如多发性骨髓瘤、冒烟型骨髓瘤 (亦称为顽固性骨髓瘤)、意义不明单克隆伽玛球蛋白症 (MGUS)、

孤立性浆细胞瘤、IgG骨髓瘤、轻链骨髓瘤、非分泌型骨髓瘤及淀粉样变性；及该等血液系统肿瘤的任何组合。

[0199] 在其他实施方案中，血液恶性肿瘤系选自急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、T细胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤(HL)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、多发性骨髓瘤、冒烟型骨髓瘤、意义不明单克隆伽玛球蛋白症(MGUS)、晚期、转移性、顽抗性和/或复发性血液系统肿瘤以及该等血液系统肿瘤的任何组合。

[0200] 本发明的方法亦适用于治疗晚期、转移性、顽抗性和/或复发性血液系统肿瘤。

[0201] 对于抗CCR8在治疗癌症中的临床试验(实施例34)，基于上述不同临床前研究的结果来选择某些实体肿瘤：在小鼠肿瘤模型中显示抗CCR8的功效(实施例23-29)；癌症基因体图谱(国家癌症研究所, 2021)中表示的33种肿瘤类型中的CCR8及CD8A的RNA表达、鉴定具有CCR8的相对高表达及富含CD8A表达的肿瘤类型(实施例32)；及如通过IHC所测量的17种肿瘤类型或亚型中的CCR8表达量(实施例33)。所选择的肿瘤类型为NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/胃食道(GE)接合区腺癌及子宫颈癌(鳞状细胞癌[SCC]或腺癌)。尽管可获得的晚期肿瘤的数据有限，但此选择系由高CCR8表达量或Treg的存在与NSCLC、CRC、胃及子宫颈癌中的较差预后相关联支持(Shah等人, 2011; Yi等人, 2018; Zhao等人, 2016; Tao等人, 2012; Xu等人, 2020)。关于SCCHN的预后的报道具有混合性，可能部分由于用于侦测Treg的存在不同方法及分子标志物(Saleh等人, 2020)。因此，在所公开的用于治疗癌症的方法的某些实施方案中，实体肿瘤为选自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合区癌症及子宫颈癌的癌症。在某些优选的实施方案中，实体肿瘤为NSCLC。在其他优选的实施方案中，实体肿瘤为SCCHN。在其他优选的实施方案中，实体肿瘤为MSS-CRC。在其他优选的实施方案中，实体肿瘤为胃/GE接合区癌症。在其他优选的实施方案中，实体肿瘤为子宫颈癌。

[0202] 抗CCR8及抗PD-1/抗PD-L1 Ab的医学用途

本发明还提供经分离的抗CCR8 Ab，优选mAb，或其抗原结合部分，其系用于治疗罹患癌症的个体的方法中。本发明还提供经分离的抗CCR8 Ab，优选mAb或其抗原结合部分，及检查点抑制剂，诸如经分离的抗PD-1/抗PD-L1 Ab，优选mAb，或其抗原结合部分，其系组合用于治疗罹患癌症的个体的方法中，该方法包含双重Treg消耗及检查点路径(例如，PD-1/PD-L1信号传导路径)的阻断。抗CCR8 Ab可以单药疗法或与检查点抑制剂(诸如抗PD-1/抗PD-L1 Ab)的组合形式用于治疗本文中所公开的全部范围的癌症。

[0203] 所公开的本发明的一个方面需要使用本发明的经分离的抗CCR8 Ab或其抗原结合部分来制备用于治疗罹患癌症的个体的药剂。抗CCR8 Ab可单独或与检查点抑制剂(诸如经分离的抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分)组合用于制备用以治疗癌症患者的药剂。任何此类抗CCR8 Ab及抗PD-1/抗PD-L1 Ab用于制备药剂的用途广泛适用于本文中所公开的全部范围的癌症。

[0204] 本发明还提供抗CCR8 Ab或其抗原结合部分与检查点抑制剂(诸如经分离的抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分)的组合，其系用于对应于使用本文中所描述的此治疗剂组合的治疗方法的所有实施方案的治疗癌症的方法中。

[0205] 适用于所公开的治疗方法的抗CCR8 Ab

适用于所公开的方法的抗CCR8 Ab为分离的Ab，优选mAb，或其抗原结合部分，其以

高特异性及亲和力特异性结合表达于细胞表面上的CCR8且介导通过ADCC进行的表达CCR8的细胞的消耗。此类Ab呈现对于治疗功效而言重要的一或多种特性。特定地,分离的Ab或其抗原结合部分呈现以下特性中的至少一者:

(a) 以约20nM或更低,优选约2nM或更低,优选约1或更低的 EC_{50} 特异性结合表达于细胞表面上的CCR8;

(b) 特异性结合胸腺的髓质及皮肤的真皮中的稀少及分散的免疫细胞,但不结合例如人类大脑、小脑、心脏、肝脏、肺、肾脏、扁桃体、脾、胸腺、结肠、胃、胰腺、肾上腺、垂体、皮肤、外周神经、睾丸或子宫组织或PBMC。举例而言,抗CCR8 mAb或其抗原结合部分可特异性结合肿瘤浸润性Treg,但不结合PBMC,例如,在固定的PBMC中不展示细胞质染色。举例而言,可通过例如在固定的组织样品上用相关Ab进行标准染色(例如,通过实施例14中描述的方法)来确定Ab不与上述列表中的细胞及组织结合;

(c) 以约5nM或更低的 IC_{50} 抑制CCL1与CCR8的结合及抑制CCR8/CCL1信号传导;

(d) 当结合细胞表面上的CCR8时,以约100pM或更低,优选约60pM或更低,优选约40pM或更低,更优选约13pM或更低,更优选10pM或更低的 EC_{50} 介导细胞的消耗;

(e) 当在存在或不存在交联Ab的情况下结合细胞表面上的CCR8时,不引起CCR8的内化;

(f) 当以单药疗法形式施用于个体时,抑制个体中的肿瘤细胞的生长;及

(g) 当与其他治疗剂组合施用于个体以用于治疗癌症时,抑制个体中的肿瘤细胞的生长,任选其中其他治疗剂为免疫检查点抑制剂,任选其中检查点抑制剂为抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 Ab。

[0206] 在某些实施方案中,分离的Ab或其抗原结合部分呈现至少2或3种,优选4、5或6种前述特性。在更优选实施方案中,分离的Ab或其抗原结合部分呈现所有前述特性。举例而言,在某些优选的实施方案中,分离的Ab或其抗原结合部分:

(a) 以约20nM或更低,优选约2nM或更低,优选约1或更低的 EC_{50} 特异性结合表达于细胞表面上的CCR8;

(b) 当结合细胞表面上的CCR8时,以约100pM或更低,约60pM或更低,优选约40pM或更低,更优选约13pM或更低,更优选10pM或更低的 EC_{50} 介导细胞的消耗;

(c) 当以单药疗法形式施用于个体时,抑制个体中的肿瘤细胞的生长;及

(d) 当与其他治疗剂组合施用于个体以用于治疗癌症时,抑制个体中的肿瘤细胞的生长,任选其中其他治疗剂为检查点抑制剂。

[0207] 在其他优选的实施方案中,分离的Ab或其抗原结合部分:

(a) 以约2nM或更低的 EC_{50} 特异性结合表达于细胞表面上的CCR8;

(b) 当结合细胞表面上的CCR8时,以约40pM或更低的 EC_{50} 介导细胞的消耗;及

(c) 当与其他治疗剂组合施用于个体以用于治疗癌症时,抑制个体中的肿瘤细胞的生长,任选其中其他治疗剂为抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 Ab。

[0208] 在某些实施方案中,呈现一或多种,至多所有前述功能特性的分离的Ab,例如mAb,或其抗原结合部分进一步以约10nM或更低的 K_D 结合位于hCCR8的N端结构域中的表位,其中表位包含具有序列 $Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$ (SEQ ID NO:2)以及硫酸化tyr-15和/或tyr-17残基的肽。在某些其他实施方案中,呈现一或多种,至多所有前述功能特性的分离的Ab,例如

mAb,或其抗原结合部分进一步以约10nM或更低的 K_D 结合位于人CCR8的N端结构域中的表位,其中表位包含具有序列 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (SEQ ID NO:109)以及硫酸化tyr-15及tyr-17残基的肽。

[0209] 在某些实施方案中,分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分可具有以上特性和/或包含以下中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3结构域: V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸。举例而言,此类Ab或其抗原结合部分可包含如由Kabat方法定义的以下CDR:重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:33所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:34所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:35所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:36所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:37所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:38所示序列的连续连接的氨基酸。作为另一实例,此类Ab或其抗原结合部分可包含 V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸。作为另一实例,此类Ab可包含重链,其包含具有如SEQ ID NO:100所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:112所示序列的连续连接的氨基酸。任选地,Ab的重链具有降低的岩藻糖基化作用,或具有低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的重链恒定区,如本文中其他地方所描述。

[0210] 在某些实施方案中,分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分可具有以上特性和/或包含以下中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3结构域: V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸。举例而言,此类Ab或其抗原结合部分可包含如由Kabat方法定义的以下CDR:重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:103所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:104所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:105所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:106所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:107所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:108所示序列的连续连接的氨基酸。作为另一实例,此类Ab或其抗原结合部分可包含 V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸。作为另一实例,此类Ab可包含重链,其包含具有如SEQ ID NO:117所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:118所示序列的连续连接的氨基酸。任选地,Ab的重链具有降低的岩藻糖基化作用,或具有低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的重链恒定区,如本文中其他地方所描述。

[0211] 在某些实施方案中,分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分可具有以上特性和/或包含以下中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3结构域: V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。举例而言,此类Ab或其抗原结合部分可包含重链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:45所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:46所示序列的连续连接的氨基酸;重链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:47所示序列的连续连接的

氨基酸;轻链可变区CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:48所示序列的连续连接的氨基酸;轻链可变区CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:49所示序列的连续连接的氨基酸;及轻链可变区CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:50所示序列的连续连接的氨基酸。在另一实例中,此类Ab或其抗原结合部分可包含V_H,其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸,及V_L,其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。在另一实例中,此类Ab可包含重链,其包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸。任选地,Ab的重链具有降低的岩藻糖基化作用,或具有低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的重链恒定区,如本文中其他地方所描述。

[0212] 组合疗法

人CCR8⁺ Treg亦共同表达大量PD-1(资料未展示)。用抗PD-1 mAb进行治疗可活化PD-1⁺ Treg,潜在地解释用纳武单抗治疗的胃癌患者中的过度进展或原发性抗性(Kamada等人,2019)。因此,Treg消耗可能改良对抗PD-1疗法的总体反应率。此组合亦由临床前小鼠研究直接支持,其中在MB49及4T-1肿瘤模型中观测到抗CCR8与抗PD-1的协同作用(实施例27及28)。

[0213] 尽管本文中已使用抗PD-1 Ab证明用抗CCR8 Ab与检查点抑制剂进行的组合疗法的功效,但已鉴定调节T细胞反应的若干其他共刺激性及抑制性受体及配体。刺激性受体的实例包括可诱导型T细胞共刺激剂(ICOS)、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、CD27、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)及疱疹病毒侵入介体(HVEM),而除PD-1/PD-L1以外,抑制性受体的实例包括细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白质4(CTLA-4)、B及T淋巴细胞衰减因子(BTLA)、T细胞免疫球蛋白及黏蛋白域-3(TIM-3)、淋巴细胞活化基因-3(LAG-3)、杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)、腺苷A2A受体(A2aR)、杀伤细胞凝集素样受体G1(KLRG-1)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、CD160、具有Ig及ITIM域的T细胞免疫受体(TIGIT)以及T细胞活化的V结构域Ig抑制因子(VISTA)的受体(Mellman等人,2011;Pardoll,2012;Baitsch等人,2012)。这些受体及其配体提供治疗剂的目标,该等治疗剂经设计以刺激免疫反应或防止免疫反应的抑制,以便由此攻击肿瘤细胞(Weber,2010;Mellman等人,2011;Pardoll,2012)。刺激性受体或受体配体系由激动剂靶向,而抑制性受体或受体配体系由阻断剂靶向。因为许多免疫检查点系由配体-受体相互作用启动,所以其可容易地通过Ab来阻断或通过配体或受体的重组形式来调节。除PD-1/PD-L1以外,调节T细胞反应的共刺激性及抑制性受体及配体中的一者或多者可提供与本文中所公开的抗CCR8 Ab发挥协同作用以抑制肿瘤生长的目标。举例而言,在某些实施方案中,将抗CCR8 Ab与抗CTLA-4 Ab组合。在其他实施方案中,将抗CCR8 Ab与抗LAG-3Ab组合。

[0214] 放射疗法在鼠类模型(Muroyama等人,2017)及人类(未公开的资料)中引起治疗后的Treg浸润的增加。Treg浸润增加可引起抗肿瘤免疫的不合需要的抑制,且CCR8介导的消耗可增强放射疗法的功效。

[0215] 本发明提供抗CCR8 mAb,其通过增强治疗(诸如检查点抑制或放射疗法)的抗肿瘤功效来有效增强免疫反应且其呈现以下合乎需要的特征中的至少一种、若干种或全部:(a)以约1nM或更低的EC₅₀特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8;(b)特异性结合胸腺的髓质及皮肤的真皮中的稀少及分散的免疫细胞,但不结合例如人类大脑、小脑、心脏、肝脏、肺、肾脏、扁桃体、脾、胸腺、结肠、胃、胰腺、肾上腺、垂体、皮肤、外周神经、睾丸或子宫组织或

PBMC。举例而言,抗CCR8 mAb或其抗原结合部分可特异性结合肿瘤浸润性Treg,但不结合PBMC,例如,在固定的PBMC中不展示细胞质染色。举例而言,可通过用相关Ab对例如固定的组织样品进行标准染色(例如,通过实施例14中所描述的方法)来确定Ab不与上述列表中的细胞及组织结合;(c)以约5nM或更低的 IC_{50} 抑制CCL1与CCR8的结合及抑制CCR8/CCL1信号传导;(d)当结合细胞表面上的CCR8时,以约50pM或更低的 EC_{50} 介导细胞的消耗;(e)在存在或不存在交联Ab的情况下结合细胞表面上的CCR8时,不引起CCR8的内化;(f)当以单药疗法形式施用于个体时,抑制个体中的肿瘤细胞的生长;及(g)当与其他治疗剂组合施用于个体以用于治疗癌症时,抑制个体中的肿瘤细胞的生长,任选其中其他治疗剂为抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 Ab。

[0216] 可用于本文中所描述的治疗方法、组合物或试剂盒中的某些抗CCR8 mAb包括以高亲和力特异性结合细胞表面上的hCCR8、以约10pM或更低的 EC_{50} 介导细胞的消耗及呈现至少两种其他且优选所有前述特性的mAb。在某些实施方案中,分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分可具有以上特性中的至少一者和/或包含以下中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3结构域: V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸。举例而言,此类Ab或其抗原结合部分可包含如由Kabat方法定义的以下CDR: V_H CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:33所示序列的连续连接的氨基酸; V_H CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:34所示序列的连续连接的氨基酸; V_H CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:35所示序列的连续连接的氨基酸; V_L CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:36所示序列的连续连接的氨基酸; V_L CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:37所示序列的连续连接的氨基酸;及 V_L CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:38所示序列的连续连接的氨基酸。在另一实例中,此类Ab或其抗原结合部分可包含 V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:4所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:16所示序列的连续连接的氨基酸。在另一实例中,此类Ab可包含重链,其包含具有如SEQ ID NO:100所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:112所示序列的连续连接的氨基酸。任选地,Ab的重链具有降低的岩藻糖基化作用,或具有低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的重链恒定区,如本文中其他地方所描述。

[0217] 在某些实施方案中,分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分可具有以上特性中的至少一者和/或包含以下中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3结构域: V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸。举例而言,此类Ab或其抗原结合部分可包含如由Kabat方法定义的以下CDR: V_H CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:103所示序列的连续连接的氨基酸; V_H CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:104所示序列的连续连接的氨基酸; V_H CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:105所示序列的连续连接的氨基酸; V_L CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:106所示序列的连续连接的氨基酸; V_L CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:107所示序列的连续连接的氨基酸;及 V_L CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:108所示序列的连续连接的氨基酸。作为另一实例,此类Ab或其抗原结合部分可包含 V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:115所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:116所示序列的连续连接的氨基酸。作为另一实例,此类Ab可包含重链,其包含具有如SEQ ID NO:117所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:118所示序列的连续连接的氨基酸。任选地,Ab的重链具有降低的岩藻糖

基化作用,或具有低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的重链恒定区,如本文中其他地方所描述。

[0218] 在某些实施方案中,分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分可具有以上特性中的至少一者和/或包含以下中的每一者中的CDR1、CDR2及CDR3结构域: V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。举例而言,此类Ab或其抗原结合部分可包含如由Kabat方法定义的以下CDR: V_H CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:45所示序列的连续连接的氨基酸; V_H CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:46所示序列的连续连接的氨基酸; V_H CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:47所示序列的连续连接的氨基酸; V_L CDR1,其包含具有如SEQ ID NO:48所示序列的连续连接的氨基酸; V_L CDR2,其包含具有如SEQ ID NO:49所示序列的连续连接的氨基酸;及 V_L CDR3,其包含具有如SEQ ID NO:50所示序列的连续连接的氨基酸。在另一实例中,此类Ab或其抗原结合部分可包含 V_H ,其包含具有如SEQ ID NO:6所示序列的连续连接的氨基酸,及 V_L ,其包含具有如SEQ ID NO:18所示序列的连续连接的氨基酸。在另一实例中,此类Ab或其抗原结合部分可包含重链,其包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸。任选地,Ab的重链具有降低的岩藻糖基化作用,或具有低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的重链恒定区,如本文中其他地方所描述。

[0219] 适用于所公开的治疗方法的抗PD-1/抗PD-L1 Ab

适用于本文中所公开的用于癌症治疗的方法、组合物或试剂盒的抗PD-1 Ab包括分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其以高特异性及亲和力结合PD-1、阻断PD-L1和/或PD-L2与PD-1的结合且抑制PD-1信号传导路径的免疫抑制作用。类似地,适用于这些方法的抗PD-L1 Ab为分离的Ab,优选mAb,或其抗原结合部分,其以高特异性及亲和力结合PD-L1、阻断PD-L1与PD-1及CD80(B7-1)的结合且抑制PD-1信号传导路径的免疫抑制作用。在本文中所公开的治疗方法中的任一者中,抗PD-1或抗PD-L1 Ab分别包括结合PD-1受体或PD-L1配体的抗原结合部分或片段,且在抑制受体-配体结合及逆转T细胞活性的抑制方面呈现与完全Ab类似的功能特性,藉此上调免疫反应。

[0220] 抗PD-1 mAb

以高亲和力特异性结合PD-1的mAb已公开于美国专利第8,008,449号中。其他抗PD-1mAb已描述于例如美国专利第7,488,802号、第8,168,757号、第8,354,509号及第9,205,148号中。已证明美国专利第8,008,449号中所公开的抗PD-1 mAb呈现若干种或所有以下特征:(a)以约50nM或更低的 K_D 结合人PD-1,如通过SPR(BIACORE®)生物传感器系统所测定;(b)实质上不结合人CD28、CTLA-4或ICOS;(c)在混合淋巴细胞反应物(MLR)测定法中增加T细胞增殖、干扰素- γ 产生及IL-2分泌;(d)结合人PD-1及食蟹猕猴PD-1;(e)抑制PD-L1及PD-L2与PD-1的结合;(f)缓解由Treg细胞引起的对CD4+CD25⁻ T细胞的增殖及干扰素- γ 产生的抑制;(g)刺激抗原特异性记忆反应;(h)刺激Ab反应;及(i)活体内抑制肿瘤细胞生长。可用于所公开的治疗方法、组合物或试剂盒中的抗PD-1 Ab包括以高亲和力特异性结合人PD-1且呈现至少五种且优选所有前述特征的mAb。举例而言,适用于本文中所公开的治疗方法的抗PD-1 Ab:(a)以约10nM至0.1nM的 K_D 结合人PD-1,如通过SPR(BIACORE®)所测定;(b)在MLR测定法中增加T细胞增殖、干扰素- γ 产生及IL-2分泌;(c)抑制PD-L1及PD-L2与

PD-1的结合；(d) 逆转由Treg引起的对CD4⁺CD25⁻ T细胞的增殖及干扰素- γ 产生的抑制；(e) 刺激抗原特异性记忆反应；及(f) 活体内抑制肿瘤细胞生长。

[0221] 其他抗PD-1 mAb已描述于例如美国专利第6,808,710号、第7,488,802号、第8,168,757号及第8,354,509号、美国公开第2016/0272708号以及PCT公开第WO 2008/156712号、第WO 2012/145493号、第WO 2014/179664号、第WO 2014/194302号、第WO 2014/206107号、第WO 2015/035606号、第WO 2015/085847号、第WO 2015/112800号、第WO 2015/112900号、第WO 2016/106159号、第WO 2016/197367号、第WO 2017/020291号、第WO 2017/020858号、第WO 2017/024465号、第WO 2017/024515号、第WO 2017/025016号、第WO 2017/025051号、第WO 2017/040790号、第WO 2017/106061号、第WO 2017/123557号、第WO 2017/132827号、第WO 2017/133540中,其各自的公开内容以全文引用的方式并入本文中。

[0222] 在某些实施方案中,抗PD-1 mAb系选自由以下组成的群:纳武单抗(OPDIVO®;先前称为5C4、BMS-936558、MDX-1106或ONO-4538)、派姆单抗(KEYTRUDA®;先前称为拉立珠单抗(lambrolizumab)及MK-3475;参见WO 2008/156712A1)、PDR001(参见WO 2015/112900)、MEDI-0680(先前称为AMP-514;参见WO 2012/145493)、REGN-2810(参见WO 2015/112800)、JS001(参见Liu及Wu,2017)、BGB-A317(参见WO 2015/035606及US 2015/0079109)、INCSHR1210(SHR-1210;参见WO 2015/085847;Liu及Wu,2017)、TSR-042(ANB011;参见WO 2014/179664)、GLS-010(WBP3055;参见Liu及Wu,2017)、AM-0001(参见WO 2017/123557)、STI-1110(参见WO 2014/194302)、AGEN2034(参见WO 2017/040790)及MGD013(参见WO 2017/106061)。

[0223] 在本文中所描述的包含抗PD-1 Ab的给药的任何治疗方法的某些优选的实施方案中,抗PD-1 Ab为纳武单抗(OPDIVO®),其已由美国食品及药物管理局(U.S.Food and Drug Administration;FDA)批准用于治疗多种不同癌症。纳武单抗为完全人IgG4(S228P)PD-1免疫检查点抑制剂Ab,其选择性地阻止与PD-1配体(PD-L1及PD-L2)的相互作用,藉此阻断抗肿瘤T细胞功能的下调(在美国专利第8,008,449号中描述为mAb C5;Wang等人,2014)。在其他优选的实施方案中,抗PD-1 Ab为派姆单抗(KEYTRUDA®;针对PD-1的人源化单克隆IgG4 Ab且在美国专利第8,354,509号中描述为h409A11),其亦被批准用于多种癌症适应症。

[0224] 可用于所公开的方法、组合物或试剂盒中的抗PD-1 Ab亦包括分离的Ab,优选mAb,其特异性结合人PD-1(hPD-1)且与本文中所描述的抗PD-1 Ab中的任一者(例如,纳武单抗(5C4;参见例如美国专利第8,008,449号;WO 2013/173223)及派姆单抗)交叉竞争结合人PD-1。与参考Ab(例如,纳武单抗或派姆单抗)交叉竞争结合抗原(在此情况下,人PD-1)的Ab可在标准PD-1结合测定法(诸如BIACORE®分析、ELISA测定法或流式细胞术)中容易地鉴定(参见例如,WO 2013/173223)。在某些实施方案中,抗PD-1 Ab与本文中所描述的抗PD-1 Ab中的任一者(例如,纳武单抗或派姆单抗)结合相同表位。

[0225] 可用于所公开的本发明的方法中的抗PD-1 Ab还包括抗原结合部分,包括Fab、F(ab')₂、Fd或Fv片段、sdAb、scFv、二-scFv(di-scFv)或双-scFv(bi-scFv)、diabody、微型抗体(minibody)或经分离的CDR(关于其他细节,参见Hollinger及Hudson,2005;Olafsen及Wu,2010)。

[0226] 在某些实施方案中,经分离的抗PD-1 Ab或其抗原结合部分包含具有人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同型的重链恒定区。在某些优选的实施方案中,抗PD-1 Ab或其抗原结合部分包含具有人IgG4同型的重链恒定区。在其他实施方案中,抗PD-1 Ab或其抗原结合部分具有人IgG1同型。在某些其他实施方案中,抗PD-1 Ab或其抗原结合部分的IgG4重链恒定区含有S228P突变(使用系统编号;Kabat等人,1983),其用通常在IgG1同型Ab中的相应位置处发现的脯氨酸残基置换铰链区中的丝氨酸残基。存在于纳武单抗中的此突变防止Fab臂与内源性IgG4 Ab交换,同时保留与野生型IgG4 Ab相关的活化Fc受体的低亲和力(Wang等人,2014)。在其他实施方案中,Ab包含轻链恒定区,其为人类 κ 或 λ 恒定区。

[0227] 在本发明的方法的其他实施方案中,抗PD-1 Ab或其抗原结合部分为mAb或其抗原结合部分。关于对人类个体的给药,抗PD-1 Ab优选为嵌合Ab或更优选为人源化或人Ab。此类嵌合、人源化或人类mAb可通过本领域熟知的方法制备及分离,例如美国专利第8,008,449号中所描述。

[0228] 抗PD-L1 mAb

因为抗PD-1及抗PD-L1靶向相同信号传导路径且已在临床试验中证实在各种癌症中呈现类似的功效水平(参见例如,Brahmer等人,2012;WO 2013/173223),因此抗PD-L1 Ab可取代本文中所公开的组合疗法方法中的抗PD-1 Ab。

[0229] 适用于所公开的方法、组合物或试剂盒的抗PD-L1 Ab为分离的Ab,其以高特异性及亲和力结合PD-L1、阻断PD-L1与PD-1及CD80的结合且抑制PD-1信号传导路径的免疫抑制作用。以高亲和力特异性结合PD-L1的mAb已公开于美国专利第7,943,743号中。其他抗PD-L1 mAb已描述于例如美国专利第8,217,149号、第8,779,108号、第9,175,082号及第9,624,298号,及PCT公开第WO 2012/145493号。已证明美国专利第7,943,743号中所公开的抗PD-1HuMAb呈现以下特征中的一者或多者:(a)以约50mM或更低的 K_D 结合人PD-1,如通过SPR(BIACORE®)所测定;(b)在MLR测定法中增加T细胞增殖、干扰素- γ 产生及IL-2分泌;(c)刺激Ab反应;(d)抑制PD-L1与PD-1的结合;及(e)逆转Treg对T细胞效应细胞和/或树突状细胞的抑制作用。用于本文中所公开的治疗方法中的抗PD-L1 Ab包括分离的Ab,优选mAb,其以高亲和力特异性结合人PD-L1且呈现至少一种,在一些实施方案中至少三种,且优选所有前述特征。举例而言,适用于这些方法的抗PD-L1 Ab:(a)以约50mM至0.1mM的 K_D 结合人PD-1,如通过表面电浆共振(BIACORE®)所测定;(b)在MLR测定法中增加T细胞增殖、干扰素- γ 产生及IL-2分泌;(c)抑制PD-L1与PD-1及CD80的结合;及(d)逆转Treg对T细胞效应细胞和/或树突状细胞的抑制作用。

[0230] 适用于本发明的方法的抗PD-L1为BMS-936559(先前称为MDX-1105;在美国专利第7,943,743号中称为12A4)。其他适合的抗PD-L1 Ab包括阿特珠单抗(TECENTRIQ®;先前称为RG7446及MPDL3280A;在美国专利第8,217,149号中称为YW243.55S70;亦参见Herbst等人,2014)、德瓦鲁单抗(IMFINZI®;先前称为MEDI-4736;在美国专利第8,779,108号中称为2.14H90PT)、艾维路单抗(BAVENCIO®;先前称为MSB-0010718C;在美国专利第9,624,298号中称为A09-246-2)、STI-A1014(在美国专利第9,175,082号中称为H6)、CX-072(参见WO 2016/149201)、KN035(参见Zhang等人,2017)、LY3300054(参见例如WO 2017/034916)及CK-301(参见Gorelik等人,2017)。

[0231] 在本文中所描述的包含抗PD-L1 Ab的给药的治疗方法中的任一者的某些优选的实施方案中,抗PD-L1 Ab为阿特殊单抗(TECENTRIQ®)。在其他优选的实施方案中,抗PD-L1 Ab为德瓦鲁单抗(IMFINZI®)。在其他优选的实施方案中,抗PD-L1 Ab为艾维路单抗(BAVENCIO®)。

[0232] 适用于所公开的方法、组合物或试剂盒的抗PD-L1 Ab亦包括分离的Ab,其特异性结合人PD-L1且与参考Ab交叉竞争结合人PD-L1,该参考Ab可为本文中所公开的抗PD-L1 Ab中的任一者,例如BMS-936559 (12A4; 参见例如美国专利第7,943,743号;WO 2013/173223)、阿特殊单抗、德瓦鲁单抗、艾维路单抗或STI-A1014。Ab与参考Ab交叉竞争结合人PD-L1的能力表明此类Ab与参考Ab结合PD-L1的相同的表位区域且借助于结合PD-L1的实质上相同的表位区域,预期具有与参考Ab极类似的功能特性。在一些实施方案中,抗PD-L1 Ab与本文中所描述的抗PD-L1 Ab中的任一者(例如,阿特殊单抗、德瓦鲁单抗、艾维路单抗或STI-A1014)结合相同的表位。可在标准PD-L1结合测定法(诸如BIAcore®分析、ELISA测定法或本领域技术人员熟知的流式细胞术,参见例如WO 2013/173223)中基于与参考Ab(诸如阿特殊单抗或艾维路单抗)交叉竞争的能力而容易地鉴定交叉竞争性Ab。

[0233] 在某些优选的实施方案中,用于本发明的方法中的经分离的抗PD-L1 Ab为mAb。在其他实施方案中,尤其对于人类个体的给药,这些Ab优选为嵌合Ab或更优选为人源化或人Ab。嵌合、人源化或人Ab可通过本领域熟知的方法制备及分离,例如美国专利第7,943,743号中所描述。

[0234] 在某些实施方案中,抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分包含具有人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同型的重链恒定区。在某些其他实施方案中,抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分具有IgG4同型的人IgG1。在其他实施方案中抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分的IgG4重链恒定区的序列含有S228P突变。在其他实施方案中,Ab包含轻链恒定区,其为人类κ或λ恒定区。

[0235] 本发明的抗PD-L1 Ab亦包括以上Ab的抗原结合部分,包括Fab、F(ab')₂、Fd、Fv及scFv、二-scFv(di-scFv)或双-scFv(bi-scFv)以及scFv-Fc片段、纳米抗体、diabody、triabody、tetrabody及分离的CDR,其结合PD-L1且在抑制受体结合及上调免疫系统方面呈现与完全Ab类似的功能特性。

[0236] 药物组合物及给药方案

本文中所公开且用于所描述的治疗方法中的任一者的mAb可组成组合物,例如,含有Ab及药学上可接受的载体的药物组合物。本发明还提供组合物,其包含所公开的免疫偶联物或双特异性分子中的任一者及药学上可接受的载体。如本文中所使用,“药学上可接受的载体”包括生理学上兼容的任何及所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂及抗真菌剂、等张剂及吸收延迟剂以及其类似物。优选地,用于含有Ab的组合物的载剂适用于静脉内(IV)、肌肉内、皮下(SC)、肠胃外、脊椎或表皮给药(例如,通过注射或输注)。

[0237] 用于SC注射的方案系基于涉及Ab(例如,mAb)与重组人类玻尿酸酶(rHuPH20)的共同调配的Halozyme Therapeutics的ENHANZE®药物递送技术,其消除由细胞外基质造成的对可皮下递送的生物制剂及药物的体积的传统限制(美国专利第7,767,429号)。有可能将组合疗法中使用的两种Ab共同调配成单一组合物以用于SC给药。

[0238] 本发明的药物组合物可包括一或多种医药学上可接受的盐、抗氧化剂、水性及非

水性载剂和/或佐剂,诸如防腐剂、湿润剂、乳化剂及分散剂。

[0239] 调节给药方案以提供最佳所需反应,例如最大治疗反应和/或最小副作用。对于抗CCR8、抗PD-1或抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分的给药(包括用于组合使用),剂量可在每公斤个体体重约0.01至约20毫克,优选约0.1至约10毫克范围内。举例而言,剂量可为每公斤体重约0.1、0.3、1、2、3、5或10毫克且更优选为每公斤体重约0.3、1、3或10毫克。或者,代替基于体重的剂量,可施用固定剂量或平剂量(flat dose)的Ab或其抗原结合部分,例如约0.1至约2,000mg,优选约1至约1,000mg,诸如约0.3、1、3、5、10、30、60、100、150、200、240、300、400、500、600、800或1,000mg。均一(对比基于重量)给药由于易于制备、降低药物误差的风险及观测到对于大部分生物制剂,两种给药方法可以类似方式进行而具有吸引力(Wang等人,2009)。

[0240] 给药方案通常基于Ab的典型药物动力学特性而经设计以实现引起持续受体占有率(R0)的暴露。例示性治疗方案需要每周一次、每2周一次、每3周一次、每4周一次、每月一次、每3-6个月或更长时间一次给药。在某些优选的实施方案中,每2周一次向个体施用抗CCR8、抗PD-1或抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分。在其他优选的实施方案中,每3周一次或每4周一次施用Ab或其抗原结合部分。在治疗过程期间,剂量及时程可改变。使用由基于药理学及毒理学的方法的混合方法产生的全部数据获得4A19的首次用于人体(FIH)的起始平剂量,即0.3mg (4μg/kg), IV, Q2W,以确保足够的安全性同时最小化参与者对潜在次有效剂量的暴露及细胞因子释放的风险。

[0241] 在实施例34中所描述的临床试验中,使用由基于药理学及毒理学的方法的混合方法产生的全部数据测定首次用于人体(FIH)的临床研究中使用的剂量。在抗CCR8单药疗法组的剂量递增阶段中,每2周一次(Q2W)向个体静脉内(IV)施用0.3、1、3、10、30、100、300或800mg的平剂量的4A19。在组合疗法组中,在剂量递增阶段中施用相同剂量的4A19及每4周一次(Q4W)以FDA认可的480mg的平剂量静脉内施用的纳武单抗。对于剂量扩增,开放单一组及随机化组以包括来自递增阶段的不同肿瘤类型及剂量水平,且继续以单药疗法或组合疗法形式进行的治疗直至出现进展、不可接受的毒性、撤回同意书、完成26个研究疗法循环(104周)或研究结束(以首先发生的为准)。

[0242] 因此,在所公开的疗法方法的某些实施方案中,以约0.3至约800mg Q2W的平剂量,以单药疗法或与免疫检查点抑制剂(例如,抗PD-1或抗PD-L1 Ab)的组合形式向个体施用抗CCR8 Ab。更特定地,在某些实施方案中,以0.3、1、3、10、30、100、300或800mg Q2W施用抗CCR8 Ab。在某些优选的实施方案中,抗CCR8 Ab为mAb 4A19。在其他优选的实施方案中,抗CCR8 Ab为mAb 14S5或14S15h。在某些实施方案中,以3mg Q2W的平剂量向个体施用抗CCR8 Ab。在某些其他实施方案中,以10mg Q2W施用抗CCR8 Ab。在其他实施方案中,以30mg Q2W的平剂量施用抗CCR8 Ab。在其他实施方案中,以100mg Q2W的平剂量向个体施用抗CCR8 Ab。

[0243] 对于组合疗法,在某些实施方案中,免疫检查点抑制剂为抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 Ab。在某些优选的实施方案中,抗PD-1 Ab为纳武单抗。在优选的实施方案中,以480mg Q4W的平剂量向个体施用纳武单抗。

[0244] 当以组合形式使用时,可使用次治疗剂量的一种或两种Ab,例如抗CCR8、抗PD-1和/或抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分的剂量。如本文中所使用,治疗剂(诸如治疗性Ab)的“次治疗”剂量或给药系指低于典型或经认可的单药疗法剂量的剂量。举例而言,低于最初

由FDA批准的每2周3mg/kg的纳武单抗的剂量(例如每2、3或4周1.0mg/kg或更少)被视为次治疗剂量。随后FDA批准纳武单抗以每两周240mg或每4周480mg使用。因此,举例而言,低于所批准的每4周480mg的纳武单抗的给药(例如,每2、3或4周120mg或更少)被视为次治疗给药。来自接收0.3mg/kg至10mg/kg的纳武单抗给药的15名个体的R0数据表明PD-1占有率在此剂量范围内似乎与剂量无关。在所有剂量中,平均占有率为85%(范围为70%至97%),其中平均平台占有率为72%(范围为59%至81%)(Brahmer等人,2010)。因此,以0.3mg/kg进行的给药可实现充分暴露,以产生显著生物制剂活性。

[0245] 相比之下,如本文中所使用,治疗剂(诸如治疗性Ab)的“次有效”剂量或给药系指低于显著生物制剂活性所需的剂量且因此在以单药疗法或组合疗法形式施用时不引起任何有意义的治疗作用的剂量。

[0246] 在小鼠肿瘤模型中观测到的抗CCR8与抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分之间的协同相互作用可允许以次治疗剂量向癌症患者施用这些治疗剂中的一或两者。在所公开的组合法方法的某些实施方案中,以次治疗剂量向癌症患者施用抗CCR8 Ab或其抗原结合部分。在其他实施方案中,以次治疗剂量向患者施用抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分。在其他实施方案中,各自以次治疗剂量向患者施用抗PD-1/抗PD-L1及抗CCR8 Ab或其抗原结合部分。

[0247] 与以单药疗法形式使用较高剂量的个别Ab相比,此类次治疗剂量的一种或两种Ab的给药可减少不良事件。因此,所公开的组合法方法的成功之处不仅可体现在Ab的组合与用这些Ab进行的单药疗法相比改良的功效,且亦体现在组合使用较低剂量的药物与单药疗法剂量相比增加的安全性,亦即,降低的不良事件发生率。

[0248] 在本文中所公开的任何方法的某些实施方案中,抗CCR8、抗PD-1和/或抗PD-L1 Ab经调配以用于静脉内(IV)给药或皮下(SC)注射。在某些实施方案中,向个体依序施用抗CCR8 Ab或其抗原结合部分及抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其抗原结合部分。“依序”给药意谓在抗CCR8及抗PD-1/抗PD-L1 Ab中的一者之前施用另一者。可首先施用任一种Ab;亦即,在某些实施方案中,在抗CCR8 Ab之前施用抗PD-1/抗PD-L1 Ab,而在其他实施方案中,在抗PD-1/抗PD-L1 Ab之前施用抗CCR8 Ab。在某些实施方案中,通过IV输注,举例而言,通过经约60分钟时段的输注施用各Ab。在其他实施方案中,通过SC注射来施用至少一种Ab。

[0249] 在依序IV给药的某些实施方案中,出于患者便利性,抗CCR8及抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其部分系在彼此间隔30分钟内施用。通常,当在同一天通过IV给药来递送抗CCR8及抗PD-1/抗PD-L1 Ab时,每次输注使用单独的输注袋及过滤器。在第一Ab的输注之后立即进行生理盐水冲洗,以在开始第二Ab的输注之前清洗Ab的管线。在其他实施方案中,两种Ab系在彼此间隔1、2、4、8、24或48小时内施用。

[0250] 通过SC给药进行的至少一种Ab的递送可减少医疗保健从业人员进行给药所需的时间且缩短药物给药的时间。举例而言,使用SC注射可将IV给药所需的时间(通常约30-60分钟)缩短至约5分钟。在依序SC给药的某些实施方案中,抗CCR8及抗PD-1/抗PD-L1 Ab或其部分系在彼此间隔10分钟内施用。

[0251] 因为已证实部分归因于免疫系统的记忆组分,检查点抑制剂Ab可产生极持久的反应(参见例如WO 2013/173223;Lipson等人,2013;Wolchok等人,2013),所施用的抗PD-1/抗PD-L1 Ab的活性可持续数周、数月或甚至数年。在某些实施方案中,本发明的涉及依序给药

的组合疗法方法需要向先前已用抗PD-1/抗PD-L1 Ab治疗的患者施用抗CCR8 Ab。在其他实施方案中,向先前已用及计划用抗PD-1/抗PD-L1 Ab治疗的患者施用抗CCR8 Ab。在其他实施方案中,本发明的涉及依序给药的组合疗法方法需要向先前已用抗CCR8 Ab治疗的患者,任选地,在用抗CCR8 Ab治疗之后癌症仍有进展的患者施用抗PD-1/抗PD-L1 Ab。

[0252] 在某些其他实施方案中,同时施用抗PD-1/抗PD-L1及抗CCR8 mAb,以掺合为用于同时给药的医药学上可接受的调配物中的单一组合物形式,或以其中各Ab以医药学上可接受的组合物形式调配的单独的组合物形式同时进行。在某些优选的实施方案中,抗PD-1/抗PD-L1及抗CCR8 mAb系以单独的组合物形式同时施用,其中各Ab系以医药学上可接受的组合物形式调配。在其他实施方案中,抗PD-1/抗PD-L1及抗CCR8 mAb系以医药学上可接受的调配物中的单一组合物形式同时施用。

[0253] 本发明提供低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的分离的Ab,优选mAb,其特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8,其中分离的Ab包含重链,其包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸,该Ab系用于治疗罹患癌症的个体的方法,其中癌症系选自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合区癌症及子宫颈癌。

[0254] 在某些实施方案中,本发明还提供低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的分离的Ab,优选mAb,其特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8,其中分离的Ab包含重链,其包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸,该Ab系用于与另一种治疗剂组合治疗罹患癌症的个体的方法中,其中该癌症系选自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合区癌症及子宫颈癌,且其中该其他治疗剂为抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 Ab。

[0255] 在某些其他实施方案中,本发明还提供低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的分离的Ab,优选mAb,其特异性结合表达于细胞表面上的hCCR8,其中分离的Ab包含重链,其包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸,该Ab系用于与另一种治疗剂组合治疗罹患癌症的个体的方法中,其中该癌症系选自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合区癌症及子宫颈癌,其中该其他治疗剂为纳武单抗,且其中以每2周一次1-30mg的剂量向个体施用抗CCR8 Ab且以每2周一次240mg或每4周一次480mg的剂量向个体施用纳武单抗。

[0256] 本发明还提供一种用于治疗罹患癌症的个体的方法,其包含向个体施用治疗有效量的低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的抗CCR8 mAb使得个体得到治疗,该mAb包含重链,其包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸,其中该癌症系选自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合区癌症及子宫颈癌。

[0257] 在某些实施方案中,本发明还提供一种用于治疗罹患癌症的个体的方法,其包含向个体施用治疗有效量的:(a)低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的抗CCR8 mAb,其包含重链,该重链包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,该轻链包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸;及(b)另一种治疗剂,使得个体得到治疗,其中癌症系选自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合区癌症及子宫颈癌,且其中其他治疗剂为抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 Ab。

[0258] 在某些其他实施方案中,本发明还提供一种用于治疗罹患癌症的个体的方法,其包含向个体施用治疗有效量的:(a) 低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的抗CCR8 mAb,其包含重链,该重链包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,该轻链包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸;及(b) 另一种治疗剂,使得个体得到治疗,其中癌症系选自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合区癌症及子宫颈癌,其中该其他治疗剂为纳武单抗,且其中以每2周一次1-30mg的剂量向个体施用抗CCR8 Ab且以每2周一次240mg或每4周一次480mg的剂量向个体施用纳武单抗。

[0259] 本发明还提供一种用于抑制个体中的肿瘤细胞的生长的方法,其包含向个体施用治疗有效量的低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的抗CCR8 mAb,该mAb包含重链,其包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,其包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸,使得抑制个体中的肿瘤细胞的生长,其中癌症系选自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合区癌症及子宫颈癌。

[0260] 在某些实施方案中,本发明还提供一种用于抑制个体中的肿瘤细胞的生长的方法,其包含向个体施用治疗有效量的:(a) 低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的抗CCR8 mAb,其包含重链,该重链包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,该轻链包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸;及(b) 另一种治疗剂,使得抑制个体中的肿瘤细胞的生长,其中癌症系选自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合区癌症及子宫颈癌,且其中其他治疗剂为抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4 Ab。

[0261] 在某些其他实施方案中,本发明还提供一种用于抑制个体中的肿瘤细胞的生长的方法,其包含向个体施用治疗有效量的:(a) 低岩藻糖基化或未经岩藻糖基化的抗CCR8mAb,其包含重链,该重链包含具有如SEQ ID NO:102所示序列的连续连接的氨基酸,及轻链,该轻链包含具有如SEQ ID NO:114所示序列的连续连接的氨基酸;及(b) 另一种治疗剂,使得抑制个体中的肿瘤细胞的生长,其中癌症系选自NSCLC、SCCHN、MSS-CRC、胃/GE接合区癌症及子宫颈癌,其中该其他治疗剂为纳武单抗,且其中以每2周一次1-30mg的剂量向个体施用抗CCR8 Ab且以每2周一次240mg或每4周一次480mg的剂量向个体施用纳武单抗。

[0262] 试剂盒

本发明的范畴亦包括包含抗CCR8 Ab的试剂盒。试剂盒通常包括指示试剂盒的内含物的预期用途的标签及使用说明书。术语标签包括在试剂盒上或与试剂盒一起提供或以其他方式伴随试剂盒的任何书面或记录材料。因此,本发明提供一种用于治疗罹患癌症的个体的试剂盒,该试剂盒包含:(a) 在约0.01至约20毫克/公斤体重范围内的一或多个剂量(例如,约0.1或1mg/kg,或约0.1至约2,000mg固定剂量,例如约3、10、30或100mg)的Ab,例如mAb,或其抗原结合部分,其特异性结合CCR8且介导通过ADCC进行的表达CCR8的细胞的消耗;(b) 任选地,在约0.1至约20毫克/公斤体重范围内的一或多个剂量(例如,约2至约10mg/kg,或约200至约1600mg固定剂量,例如约240或480mg)的Ab,例如mAb,或其抗原结合部分,其特异性结合PD-1、PD-L1或CTLA-4;及(c) 在本文中所公开的治疗方法中的任一者中使用特异性结合CCR8的Ab或其部分且任选地,特异性结合PD-1、PD-L1或CTLA-4的Ab或其部分的说明。

[0263] 本发明进一步提供用于治疗罹患癌症的个体的试剂盒,该试剂盒包含:(a) 在约0.01至约20毫克/公斤体重范围内的一或多个剂量(例如,约0.1或1mg/kg,或约0.1至约2,

000mg固定剂量,例如约3、10、30或100mg)的Ab,例如mAb,或其抗原结合部分,其特异性结合CCR8且介导通过ADCC进行的表达CCR8的细胞的消耗;(b)约0.1至约20毫克/公斤体重的一或多个剂量(例如,约2或3mg/kg,或200至约1600mg固定剂量,例如约240或480mg)的抗PD-1/抗PD-L1 mAb或其抗原结合部分;及(c)在本文中所公开的组合疗法方法中的任一者中使用抗CCR8 mAb及抗PD-1/抗PD-L1 mAb的说明。

[0264] 在某些实施方案中,代替基于体重的剂量,试剂盒包含在约0.1至约2,000mg范围内的一或多个固定剂量的抗CCR8 Ab,优选约0.3至约1,000mg,诸如约0.3、1、3、5、10、30、60、100、150、200、240、300、400、500、600、800或1,000mg Ab或其抗原结合部分。在某些实施方案中,试剂盒包含0.3、1、3、10、30、100、300及800mg抗CCR8 Ab以用于每2周一次给药。在某些其他实施方案中,试剂盒包含约100至约600mg抗PD-1/PD-L1 Ab,例如包含240mg纳武单抗以用于每2周一次给药或480mg纳武单抗以用于每4周一次给药。在某些优选的实施方案中,抗CCR8 Ab为mAb 4A19。在其他优选的实施方案中,抗CCR8 Ab为mAb 14S15或14S15h。在某些优选的实施方案中,抗PD-1 Ab为纳武单抗。在其他优选的实施方案中,抗PD-1 Ab为派姆单抗。

[0265] 在某些实施方案中,Ab可以单位剂型形式共同封装。在用于治疗人类患者的某些优选的实施方案中,试剂盒包含本文中所公开的抗人PD-1 Ab,例如纳武单抗或派姆单抗。

[0266] 通过以下实施例进一步说明本发明,该等实施例不应视为进一步限制。在整个本申请中所引用的所有参考文献的内容以引用的方式明确并入本文中。

[0267] 实施例1

肿瘤Treg中的CCR8表达与FOXP3表达的相关性

CCR8是Treg选择性标志物

将来自非造血性来源的肿瘤的TCGA样品(Goldman等人,2019;Wang及Liu,2019;来自UCSC Xena PanCan Repository的经批次校正的FPKM值)分成各肿瘤类别(TCGA名称,仅肿瘤)且将各转录物的RNA-seq数据转换成肿瘤类型内的标准分布(平均值=0,标准偏差=1),随后组合所有肿瘤RNA数据。由对数变换的转录物的皮尔森相关矩阵(Pearson correlation matrix)进行相互等级(Mutual-Rank)距离测量(Siemers等人,2017;Huttenhower等人,2007)。

[0268] 图1A中展示的跨越所有非血基质tcga肿瘤的基因-基因相关性的基于相互等级的网状图将CCR8鉴定为Treg选择性标志物,因为当与来自TCGA的大部分癌症类型中的其他基因相邻者相比时,CCR8的转录物丰度呈现与FOXP3的强及选择性相关性。值得注意的是,共刺激性/共抑制性分子(CTLA4、ICOS、TIGIT)相对于FOXP3及标准T细胞标志物(例如,CD3E、IL2RB、SLAMF1)占据网状图的中间部分。线权重及距离指示相互等级相关性的强度。

[0269] CCR8在肝细胞癌中的FOXP3^{high}淋巴细胞上选择性表达

将数据以对数缩放形式标绘为log₂(计数+1)(Zheng等人(2017),NCBI Gene Expression Omnibus:GSE98638),且用Fauxflow R/Shiny套件(<https://github.com/NathanSiemers/FauxFlow>)建立曲线。向各点添加少量高斯噪声(Gaussian noise)以帮助观测。

[0270] 如图1B中所示,CCR8选择性表达于肝细胞癌肿瘤样品中的FOXP3^{high}淋巴细胞上,且FOXP3^{mid} CD8及CD4群体中不存在CCR8表达。

[0271] CCR8表达与其他基因的表达的相关性

在FOXP3⁺ (表达 ≥ 1) T淋巴细胞 (表达 ≥ 1) 中进行CCR8表达 ≥ 1 与CCR8表达 < 1 之间的斯皮尔曼相关性分析 (Spearman correlation analysis), 且相对于相关标志物的平均基因表达的比率标绘未经调节的斯皮尔曼P值。

[0272] 图1C展示Zheng等人 (2017) 中的转录物与FOXP3⁺细胞内的与CCR8阳性及阴性相关联。CCR8表达与较高的FOXP3表达量及Treg的标准标志物 (IL2RA、IKZF2、BATF) 含量相关联, 而较低的CCR8表达与细胞毒性T细胞标志物 (GZMA、CD8A) 相关联。

[0273] 实施例2

组织处理

人类肿瘤解离

用实验室解剖剪将肿瘤样品切碎且用杜恩斯均质器 (Dounce homogenizer) 以机械方式进一步解离或使用人类肿瘤解离试剂盒 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 及gentleMACS解离器 (Miltenyi Biotec) 根据制造商说明书以酶促方式消化。细胞悬浮液通过70 μ m细胞滤器过滤。

[0274] 人Treg分离及刺激

使用Ficoll密度梯度 (GE Healthcare) 自leukopak (AllCells) 分离PBMC。使用抗CD25微珠粒II (Miltenyi Biotec) 以磁性方式富集CD25⁺细胞。将经富集的细胞针对CD25 (4E3, Miltenyi Biotec)、CD127 (A019D5, BioLegend)、CD45RA (HI100, BioLegend) 及CD4 (SK3, BD Biosciences) 染色。用BD FACSAria II对CD4⁺ CD127_{low} CD25_{high} CD45RA⁺ Treg进行分选。在具有10%胎牛血清 (FBS; GE Healthcare, Chicago, IL) 的Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 细胞培养基 (Corning, Corning, NY) 中, 使用Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific) (每1个Treg使用3个珠粒) 扩增经分离的原生Treg。在3天之后, 以300U/ml添加IL-2 (PeproTech)。将Treg扩增及冷冻保存。在具有10%FBS及100U/ml的IL-2的RPMI培养基中, 使用CD3/CD28Dynabeads (每1个Treg使用1个珠粒) 再刺激经解冻的Treg。

[0275] 人皮肤处理

使用完全皮肤解离试剂盒 (Miltenyi Biotec) 在不存在酶P的情况下, 在MACS C试管 (Miltenyi Biotec) 中将来自正常女性腹部人皮肤 (年龄为43岁) 的皮肤活检物消化隔夜。将细胞悬浮液洗涤、过滤及染色。

[0276] 小鼠组织处理

将肿瘤切碎且接着使用250U/ml的胶原蛋白酶IV (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) 及DNase I (MilliporeSigma, Burlington, MA) 在37°C下以酶促方式消化30分钟。将经除毛的皮肤切碎且接着用500 μ g/ml的胶原蛋白酶XI (MilliporeSigma)、500 μ g/ml的玻尿酸酶 (MilliporeSigma) 及100 μ g/ml的DNase I在37°C下以酶促方式消化60分钟。使用gentleMACS解离器 (Miltenyi Biotec) 以机械方式解离脾及胸腺。经解离的脾及血液样品中的红血球 (RBC) 用氯化铵钾溶液 (Thermo Fisher Scientific) 溶解5分钟。

[0277] 研究批准

经由商业供货商 (BioIVT, Westbury, NY; MT Group, Avaden, BioOptions, Discovery Life Sciences, Los Osos, CA; AllCells, Alameda, CA) 或联合人类组织样品库

(Cooperative Human Tissue Network;CHTN)收集人类肿瘤、皮肤、脾、患者血液及健康血液白细胞层样品。在美国,在IRB认可的研究场所从提交书面知情同意书的供体收集所有样品。

[0278] 由Bristol Myers Squibb (BMS) 职业健康部门按照所有相关伦理法规提供的血液供给计划获得来自健康供体的血液。所有动物实验遵从机构指南且由BMS的IACUC根据协议161201批准。

[0279] 实施例3

CCR8标记在人肿瘤中具有低促炎性潜力的抑制性FOXP3⁺细胞
通过流式细胞术来比较若干Treg相关分子的表达谱。

[0280] 流式细胞术

对于流式细胞术,通常,用胺反应性活力染料将细胞悬浮液染色。接着,用大鼠、小鼠及人类A/B血清 (GEMCELL™;Gemini Bio,West Sacramento,CA)、HUMAN TRUSTAIN FcX™ (BioLegend) 及TRUE-STAIN MONOCYTE BLOCKER™ (BioLegend) 封闭人细胞。用FcR阻断剂 (Miltenyi Biotec) 阻断小鼠细胞。对细胞进行表面染色,且使用制造商方案使用FOXP3转录因子染色缓冲液集合 (Thermo Fisher Scientific) 进行细胞内染色。对于未结合的mAb的结合,使用适当的二级Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories)。使用BD LSRFortessa X-20获取样品且使用FlowJo (BD Biosciences) 进行分析。流式细胞术Ab的完整清单提供于表2中。

[0281] 表2:用于流动式细胞测量术分析的Ab

目标	物种	克隆	荧光团	制造商
CD45	人类	HI10	AF488	Biolegend
CCR4	人类	L291H4	PE	Biolegend
CCR4	人类	L291H4	BV510	Biolegend
CD16	人类	3G8	AF647	Biolegend
CD8a	人类	SK1	PerCP-eFluor 710	Thermo Fisher
CD56	人类	CMSSB	PE-eFluor 610	Thermo Fisher
FOXP3	人类	236A/E7	PE-Cy7	Thermo Fisher
CCR8	人类	433H	BV421	BD Biosciences

目标	物种	克隆	荧光团	制造商
CD15	人类	W6D3	BV510	BD Biosciences
CD4	人类	SK3	BV650	BD Biosciences
CD4	人类	SK3	BV605	BD Biosciences
CTLA4	人类	BNI3	BV421	BD Biosciences
HLA-DR	人类	G46-6	BUV395	BD Biosciences
PD-1	人类	EH12.1	BUV737	BD Biosciences
CD3	人类	UCHT1	BUV805	BD Biosciences
CD3	人类	UCHT1	APC	BD Biosciences
CD39	人类	A1	BV786	Biolegend
颗粒酶B	人类	QA16A02	PE	Biolegend
IFNg	人类	4S.B3	PE-eFluor 610	Thermo Fisher
IL-1R2	人类	MA5-23626	APC	Thermo Fisher
IL-2	人类	MQ1-17H12	BUV737	BD Biosciences
CD19	人类	SJ25C1	BV510	BD Biosciences
CD25	人类	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是肿瘤相关Treg的标志物

CCR8大量表达于自实体肿瘤手术切除物分离的FOXP3⁺ Treg上,但在来自患者匹配血液的Treg上的表达显著较低。相比之下,CCR4、CTLA-4及CD25由来自肿瘤及血液的Treg以类似频率表达(图2A)。与外周血液Treg相比,肿瘤Treg上的FOXP3⁺ Treg上的CCR8的以每个细胞计的丰度较高(图2B),而与外周血液Treg相比,肿瘤Treg中的CCR4表达较低。在CD4⁺ FOXP3⁻常规T细胞(CD4⁺ Tconv)上,CCR8以低于肿瘤及外周血液中的CCR4及CD25的频率表达(图2C及D)。除血液中的CD25以外,血液及肿瘤浸润性CD8⁺ T细胞展示所有四种分子的边缘表达(图2E及2F)。这些数据表明CCR8是一种在相对较低的损害抗肿瘤Teff细胞群体的风险下靶向肿瘤Treg的高选择性标志物。

[0283] 实施例4**T淋巴细胞的不同子集上的CCR8的表达**

通过流式细胞术来分析与人类肿瘤相关联的T淋巴细胞的不同子集的CCR8的表达量。以机械或酶促方式解离经切除的人类肿瘤(壶腹部、结肠直肠(CRC)、十二指肠、头部及颈部、黑素瘤、NSCLC、卵巢、腮腺、肾细胞癌(RCC)、胃、甲状腺、舌部)。为了比较外周血液中的Treg及肿瘤浸润性Treg中的CCR8表达量,使用来自CRC、RCC、黑素瘤及NSCLC患者的经切除的肿瘤。在解离或消化之后,将细胞过滤且针对活力进行染色,接着标记表面标志物,包括用结合CCR8、CD3、CD4及CD8的藻红素(PE)结合的Ab(抗hCCR8 Ab克隆L263G8; BioLegend)。在完成表面染色之后,洗涤细胞,接着固定且透化以用于针对FOXP3的细胞内染色。在洗涤之后,用流式细胞仪处理细胞样品且使用Flowjo软件(FlowJo, Ashland, OR)分析数据以计算平均荧光强度(MFI)。Treg定义为 $CD3^{+}CD4^{+}FOXP3^{+}$ T细胞,而CD4 Tconv细胞或常规CD4⁺ T细胞定义为 $CD3^{+}CD4^{+}FOXP3^{-}$ T细胞。

[0284] 如图3A中所示,CCR8由大部分肿瘤驻留Treg表达(中值82%),如由FOXP3,一种已知的Treg相关转录因子定义。相比之下,显著较小部分的常规肿瘤浸润性CD4⁺ T细胞及CD8⁺ T细胞表达CCR8(中值分别为12.65%及4.55%)。尽管一小部分CD4 Tconv细胞表达CCR8,但Treg上的以每个细胞计的CCR8的表达量显著高于CD4 Tconv细胞(中值MFI 2106对比132, $P < 0.0001$),而CD8⁺ T细胞的CCR8表达量是可忽略的(图3B)。外周血液中的Treg亦表达CCR8,但表达量明显低于在肿瘤浸润性Treg上发现的表达量(图3C)。Treg上的CCR8的特异性高表达量使得CCR8成为适于使用抗CCR8 Ab经由ADCC来消耗免疫抑制性细胞群体的目标。

[0285] 实施例5**外周Treg的亚群上的CCR8的表达**

为了研究外周Treg的不同亚群的CCR8的表达量,使用密度梯度自5名健康供体分离PBMC且针对CCR8、CD3、CD4、CD8a、FOXP3(细胞内)、CCR8及CD45RO染色。将T细胞再分成CD4⁺FOXP3⁺ T细胞(Treg)、CD4⁺FOXP3⁻ T细胞(CD4 Tconv)及CD8T细胞(CD3⁺CD8a⁺)子集。将这些子集进一步分成原生(CD45RO⁻CCR7⁺)、效应子记忆(EM; CD45RO⁺CCR7⁻)及中央记忆(CM, CD45RO⁺CCR7⁺)群体以进行CCR8表达的检验。经由流式细胞仪处理细胞且使用Flowjo软件进行分析。还从癌症患者的亚群分离PBMC且针对CCR8表达进行染色,如实施例4中关于人类肿瘤浸润性淋巴细胞所描述的。

[0286] 结果展示于图4中。图4A展示与高百分比的肿瘤浸润性Treg(中值为82%;参考图3A)上的表达相比,CCR8表达于一小部分来自健康个体的外周血液Treg上(中值为21%)。在来自健康个体的Treg群体内,CCR8在效应子记忆群体(EM)中更多地表达且在中心记忆细胞(CM)中的表达程度较低(图4B),而在原生Treg(图4B)或CD4⁺常规T细胞(图4C)上观测到极少的CCR8表达。在CCR8⁺ Treg群体内,以每个细胞计,与外周CCR8⁺ Treg相比,肿瘤相关CCR8⁺ Treg表达更多的CCR8,如通过经结合的抗CCR8 Ab的Treg所测量(图4D)。

[0287] 实施例6**抑制性最高的FOXP3^{HIGH} Treg上的CCR8的表达**

通过流式细胞术来研究FOXP3⁻ Treg以及表达中等及大量表达FOXP3的Treg上的CCR8的表达。使用解剖剪及杜恩斯装置(dounce)以机械方式解离来自2名黑素瘤及1名RCC患者的经切除的人类肿瘤。在解离之后,将细胞过滤且针对活力进行染色,接着用结合

CCR8、CD3、CD4及CD8的Ab标记表面标志物,如实施例4中所描述。在完成表面染色之后,洗涤细胞,接着固定且透性化以用于针对FOXP3的细胞内染色。在洗涤之后,用流式细胞仪处理样品且使用Flowjo软件分析数据。针对CD3⁺CD4⁺群体圈选细胞以用于分析。

[0288] 如图5中所示,CCR8主要由代表活化程度最高的Treg的CD4⁺FOXP3^{high}群体表达。在其中存在明显的FOXP3^{mid}群体的样品中,如在2名黑素瘤患者肿瘤样品中,在FOXP3^{high} T细胞中发现大部分CCR8表达。FOXP3^{mid}群体中的CCR8表达量明显较低。在一些情况下,大部分患者FOXP3⁺ T细胞呈现大量FOXP3(图5,RCC)。在这些情况下,CCR8表达与FOXP3表达重叠。已证实FOXP3^{high}CD4⁺ T细胞为真正的Treg,相比于FOXP3^{mid} CD4⁺ T细胞,其可为经活化的常规T细胞或静止Treg。

[0289] 实施例7

CCR8⁺ Treg过表达免疫抑制分子且对促炎性标志物表达不足

为了研究由肿瘤相关、表达CCR8及CCR4的T细胞进行的免疫抑制性及促炎性蛋白质的表达,使用试剂盒(Miltenyi Biotec)将通过隔夜递送自临床医师获得的经切除的肺肿瘤以酶促方式消化成单细胞悬浮液。将经解离的肿瘤细胞悬浮液在含有10%FBS的RPMI培养基(Corning)中静置过夜。在第二天,细胞在存在(用于细胞刺激)或不存在佛波醇豆蔻酸乙酸(PMA)及离子霉素的情况下,在添加布雷非德菌素A(brefeldin A;BFA)及莫能菌素(monensin)(ThermoFisher,Waltham,MA)的情况下在37℃下培养4小时,以阻断蛋白质的运输。在4小时培养之后,针对与Treg抑制及炎症相关联的表面及细胞内标志物将细胞染色且通过流式细胞术进行分析。

[0290] 图6A-D展示患者肿瘤中的CCR8⁺ Treg富含免疫抑制性分子,而在CCR4⁺ T细胞中未发现类似的富集(图7A-D)。在CCR8⁺部分中发现大部分(约80%)CD25⁺细胞,而在CCR8⁻部分中发现小于20%的CD25⁺细胞(图6A)。类似地,在CCR8⁺部分中发现几乎所有CD39⁺细胞,而小于40%的表达此标志物的细胞为CCR8⁻细胞(图6B)。约三分之一的表达IL1R2的细胞为CCR8⁺细胞,但未在CCR8⁻部分中发现IL1R2表达细胞(图6C),且当在经刺激的T细胞中测量时,CCR8⁺与CCR8⁻ T细胞中的IL1R2表达之间的差异甚至更大(图6D)。因此,就免疫抑制而言,来自患者肿瘤样品的CCR8⁺ T细胞富含若干种具有抑制功能的蛋白质,诸如CD25、CD39及IL1R2。CD39为一种外核苷酸酶,其将ATP转化成AMP且接着转化成腺苷,该腺苷对T细胞具有抑制性(Cekic等人,2011),而CD25(由Treg用于整合IL-2的IL-2受体)及IL1R2(IL-1的诱饵受体)分别潜在地充当促炎性细胞因子IL-2(Pandiyan等人,2012)及IL-1D/E(Garlanda等人,2013)的储集器。

[0291] 与CCR8⁺或CCR8⁻型T细胞形成对比,CCR4⁺及CCR4⁻ T细胞中的CD25(图7A)、CD39(图7B)及IL1R2(图7C及7D)的表达量的差异较小。因此,所靶向的CCR8⁺细胞的消耗将移除表达CD25、CD39及IL1R2的免疫抑制性Treg,而靶向CCR4的消耗将留下表达这些分子的Treg。

[0292] 使用HLA-DR作为活化标志物,CCR8表达亦与高HLA-DR表达量相关(图8A)且因此鉴定经活化的Treg,而CCR4表达并非如此(图8B)。

[0293] 用PMA及离子霉素离体刺激以酶促方式解离的患者肿瘤培养物表明,CD4⁺ T细胞的CCR8⁻部分含有绝大部分的产生IFN γ (图9A)、IL-2(图9B)及颗粒酶B(图9C)的细胞。相比之下,在此测定法中,CCR4⁺CD4⁺ T细胞为IFN γ (图10A)及IL-2(图10B)的主要生产者,表明所靶向的表达CCR4但不表达CCR8的细胞的消耗可能对抗肿瘤免疫不利。CCR4⁺及CCR4⁻ T细

胞产生类似量的颗粒酶B(图10C)。

[0294] 实施例8

产生针对CCR8的MAb

抗hCCR8 mAb

通过用各种人CCR8(hCCR8)抗原对不同啮齿动物进行免疫接种来产生人源化、嵌合或人类抗CCR8 mAb,该等啮齿动物包括普通C57BL/6小鼠、表达人Ig谱系的转基因小鼠的不同品系以及具有CCR8基因剔除的特异性产生的小鼠品系。接着,将所选择的非转基因小鼠中产生的Ab转化成人源化或嵌合Ab。

[0295] 用CCR8抗原进行免疫接种

为了产生针对hCCR8的Ab,用hCCR8抗原对2-5只啮齿动物的群组进行免疫接种,其中各群组经历包含CCR8抗原、剂量、注射途径、佐剂、动物品系、动物年龄及免疫接种时序的独特组合的免疫接种策略。对58个群组中的总共222只动物进行免疫接种。对同型接合CCR8基因剔除小鼠(来源于C57BL/6)、5种不同品系的人Ig转基因小鼠、野生型小鼠(BALB/C、C57BL/6)及亚美尼亚仓鼠(Armenian hamster)进行免疫接种。

[0296] 用广泛多种抗原进行免疫接种,该等抗原包含17种含有完全或部分hCCR8蛋白质序列的抗原组合物中的一者或多者。通常,用 $2-5 \times 10^6$ 个过表达CCR8的细胞(经转染或转导的HEK 293F、BA/F3或CHO稳定细胞株)、经由差速离心自这些细胞分离的富含质膜的部分、来源于暂时过表达hCCR8的293细胞的经清洁剂溶解的脂质稳定化CCR8蛋白质(蛋白脂质体、双层膜微胞、微胞)或具有用于增强的稳定性的CCR8跨膜突变的细胞株(Abilite Bio, San Diego, CA),经由脚掌或尾根对小鼠进行免疫接种至多12次。经由腹膜内及皮下注射来递送用细胞及质膜部分进行的类似免疫接种。

[0297] 在许多情况下,使用3-10 μ g具有对应于hCCR8的N端序列的两个磺基酪氨酸残基的钥孔血蓝蛋白(KLH)结合的35个残基型肽作为抗原。在一些情况下,在10次免疫接种计划表中,此N端肽系在第3、第5及第7次给药时与hCCR8 293F细胞一起提供,从而增强针对CCR8N端的Ab反应且使其成熟,因为结合此肽序列的Ab与下游测定法中的功效相关联。在其他情况下,此N端肽系与每次细胞或质膜部分免疫接种组合提供,或在不提供其他抗原的情况下单独提供。

[0298] 在一些情况下,用编码CCR8的DNA质体经由胫骨前肌及四头肌的肌肉内注射对小鼠进行免疫接种,接着进行先前所描述的细胞或N端肽免疫接种。亦使用模拟CCR8的第二细胞外循环的限制性肽、具有CCR8的病毒样颗粒及其他以重组方式经工程改造的CCR8材料(脂蛋白元,及具有增强的稳定性的CCR8跨膜突变的细胞株)。将一些基于细胞及质膜的抗原使用苦味基磺酸(Sigma-Aldrich)进行半抗原标记以提高免疫原性。在一些情况下,在免疫接种期间交替提供hCCR8及食蟹猕猴CCR8(cCCR8)抗原。通常将含有单磷酸基脂质A的RIBI佐剂(Sigma-Aldrich)与免疫接种一起递送,以与抗原的1:1混合形式或以相邻注射形式递送以免破坏脂质双层及CCR8蛋白质构形。动物在18与177天之间的不同周期内接受免疫接种。

[0299] 为了监测免疫反应,通常在免疫接种之后4-6周,如下文所描述通过流式细胞术及ELISA来筛选来自眶后或尾部血的经滴定的血清。针对结合多种过表达CCR8的细胞株、未过表达CCR8的相应的阴性对照细胞株及与牛血清白蛋白(BSA)结合的CCR8的硫酸化N端肽的

Ab来筛选血清。测量每只动物中的CCR8特异性及CCR8非特异性Ab反应,且选择具有足够的抗CCR8Ig效价的动物进行最终免疫接种,接着在6及3天后处死且收集组织以产生杂交瘤融合物。与其他小鼠品系相比,在CCR8基因剔除小鼠中观测到优良的CCR8特异性Ab效价,且对大鼠及仓鼠进行免疫接种的有限成果亦未产生任何Ab。与KLH载体蛋白结合的CCR8的硫酸化N端肽为最佳免疫原之一,且单独或最佳与质膜部分组合起作用。相反,并非所有抗原皆起作用;举例而言,使用脂蛋白元及膜突变型细胞株作为免疫原未产生任何Ab。

[0300] 产生针对CCR8的MAb的杂交瘤的产生

自如上文所描述进行免疫接种的小鼠分离淋巴器官,包括脾及淋巴结。最典型地,自用CCR8免疫原经由脚掌及尾根进行免疫接种的小鼠收集脾、腹股沟及胯淋巴结。通过使用细胞融合电致孔器(BTX,Holliston,MA)的基于电场的电融合,通过与来源于P3X63AgU.1细胞株(ATCC CRL-1597)的永生化小鼠骨髓瘤细胞进行融合来产生杂交瘤。将所得细胞在补充有胺基喋呤(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)的培养基E(StemCell Technologies,Cambridge,MA)中涂布于平底微量滴定盘中以进行杂交瘤的选择。

[0301] 抗mCCR8 mAb

通过将编码可变区的DNA选殖至两种不同的pTT5载体(加拿大国家研究委员会(National Research Council of Canada))中且使用Expi293表达系统表达来将可商购的大鼠IgG2b抗mCCR8 mAb(克隆SA214G2;BioLegend)的同型变成mIgG2a或mIgG1-D265A。

[0302] 实施例9

抗人CCR8 MAb的筛选及选择

筛选选择性结合人CCR8的MAb

为了产生结合hCCR8的mAb,用各种hCCR8抗原对啮齿动物(包括人Ig转基因小鼠)进行免疫接种且如实施例8中所描述产生杂交瘤。在历时10-13天的培养及更换生长培养基之后,自个别孔收集杂交瘤培养物上清液且进行筛选以鉴定具有经分泌的CCR8特异性Ab的孔。最初针对至少两种细胞株(一种过表达hCCR8的细胞株及不过表达CCR8的相应的对照性细胞株)筛选所有上清液。经由基于影像的荧光微测量定法技术(FMAT)筛选、使用Intellicyt iQue Screener(Sartorius,Albuquerque,NM)的高通量384孔流式细胞术或基于黏附细胞的酶联结免疫测定法(ELISA)来测量细胞上的Ab结合。有时同时进行初始结合测定法以最大化CCR8 Ab的鉴定。针对hCCR8 Ab筛选66种杂交瘤融合物中的来自约157,250个培养物孔的上清液。

[0303] 将来自阳性孔的杂交瘤与新的培养基一起转移至24孔盘中,使其生长2-3天,接着再次通过流式细胞术进行筛选以确认结合CCR8的Ab。简言的,将75-100 μ l杂交瘤培养物上清液及过表达CCR8的细胞(诸如CHO或293F)或对照性细胞(诸如GFP-CHO或亲本293F)共同培育30-60分钟,洗涤且与结合AF647、APC或PE的抗小鼠IgG Fc或抗人IgG Fc二级Ab(Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA)一起培育。在培育及洗涤之后,通过流式细胞术来测量荧光。鉴定约328种杂交瘤克隆产生抗hCCR8 Ab,亦即,这些克隆为在融合之后约2周获得的FACS+杂交瘤上清液且包括低亲和力和结合剂,该等结合剂在针对与表达CCR8的细胞株而非对照性细胞株的结合的初始筛选中展示结合。出于各种原因,高级Ab中存在高损耗率,例如当不可分离产生抗CCR8的细胞、某些克隆在CD16交联或Treg消耗测定法中的效果不佳、一些克隆中的Ab产率低至不可接受的程度及某些Ab含有不可规避的序列可靠性

时,发生克隆损失。在328种FAC+克隆中,约90种未广泛筛选且在其余克隆中,约55种进行至被选殖至人源主链中以进行详细测试的阶段。约15%的这些Ab(包括mAb 4A19、14S15、18Y12、16B13、10R3及8D55)基于其在各种功能性测定法中的效能而被视为良好的治疗性候选物(参见例如,实施例11、14、15、17、19-23及25-29)。因此,本文中描述为介导表达CCR8的细胞的消耗的Ab的Ab包括mAb 4A19、14S15、14S15h、18Y12、16B13、10R3及8D55。

[0304] 为了将确定的抗CCR8特异性Ab的表位大体上分类,亦通过ELISA来筛选培养物上清液以测量与CCR8N端肽的结合。简言的,在4℃下,将代表硫酸化hCCR8N端的BSA结合的肽(2μg/ml)涂布于高结合型96孔板(Corning)上隔夜。将盘用BSA阻断且洗涤,接着在盘振荡器上经30-60分钟添加100μl培养物上清液。在洗涤之后,添加适当的与辣根过氧化酶(HRP)结合的抗Fc二级Ab,且用ABTS或HRP受质(SurModics, Eden Prairie, MN)培育盘且用Sunrise微板读取器(TECAN; Männedorf, Switzerland)在405或650nm下测量吸亮度。通过ELISA发现,所产生的针对hCCR8的Ab主要(但非排他地)与BSA结合的具有两个硫酸化酪氨酸残基的N端肽序列结合。在这些Ab中,结合替代性BSA结合的仅含有一个硫酸化酪氨酸的N端肽的ELISA通常显著降低,结合通常在酪氨酸残基皆未硫酸化时丧失。

[0305] 将分泌抗CCR8 Ab的杂交瘤次选殖一次或两次以确保单克隆性。简言的,在5ml半固体甲基纤维素培养基(StemCell Technologies)中将约700个活杂交瘤细胞与用于侦测杂交瘤分泌的IgG的AF488结合的抗人或抗小鼠IgG Ab(Jackson ImmunoResearch)一起涂布。在7天之后,将由单细胞产生的具有理想特性(与其他群落的距离、IgG分泌量、群落大小及群落圆度,如通过ClonePix2系统(Molecular Devices, San Jose, CA)所测量)的杂交瘤收集至96孔盘培养物中且使其生长2-4天。如先前所描述通过流式细胞术来筛选培养物上清液以确认CCR8Ab结合。在体外培养稳定的杂交瘤次克隆以产生用于亲和纯化及进一步表征的Ab。通过标准测序技术(桑格测序(Sanger sequencing)及下一代测序(next generation sequencing))获得编码Ab重链及轻链的DNA序列。比较由Ab氨基酸序列预测的质量与经由质谱获得的已知的经纯化的Ab质量以确保测序准确性。

[0306] 总体而言,在筛选所产生的Ab时,如上文所描述的与CCR8的结合且更重要的是,CD16交联(实施例17)为用于早期筛选以测定哪些Ab展示作为治疗性Ab之前景以进一步表征的两种主要测定法。对针对过表达hCCR8的293F细胞的Ab的结合滴定(实施例11)通常区分强结合物与弱结合物,且弱结合物通常在功能性测定法中的效果较差且因此通常不进行至下一筛选阶段,因此其未包括于该下一步骤中的漏斗中。在这些测定法中具有良好或中等结合或活性的Ab进行至关于原发性Treg的类似测定法,例如结合(实施例11)、钙通量(calcium flux)(实施例15)及NK介导的ADCC(实施例19),其中认为NK介导的ADCC为用于比较Ab有效性及选择引导候选物的最重要的性质之一。因为其受原生细胞限制,因此使用基于细胞株的CD16交联测定法作为ADCC替代性测定法,其通常与Treg ADCC/消耗测定法的结果良好相关(实施例19、20及22)。

[0307] 在原发性Treg ADCC测定法中,对于某些Ab,认为Y_{max}(磷脂结合蛋白V+细胞百分比)与EC₅₀值同样重要(若未比EC₅₀值更重要)。认为具有最高ADCC Y_{max}(在特异性结合时)的Ab优于具有类似的EC₅₀但较低的Y_{max}的Ab。

[0308] 实施例10

小鼠抗CCR8 MAbs的人源化

将小鼠抗CCR8 mAb人源化成4A19MAb

对小鼠抗hCCR8 mAb进行工程改造以将框架人源化成最近似的人类胚系序列(对于重链,其为hIgHV1-8*01及hIGJ4,且对于轻链,其为IGKV2D-30及hIGKJ2)。移除若干潜在序列可靠性。使重链CDR1中的单一不成对的半胱氨酸突变成丝氨酸(C35S)。通过使天冬氨酸突变成谷氨酰胺(D52Q)来移除Asp-Gly序列基序处的潜在异构化位点。尝试此位点处的四种其他突变(D52E、D52S、D52V、D52A)且基于以高亲和力结合表达CCR8的Raji细胞株的能力来选择最佳变异体,即D52Q。通过用天冬氨酸置换天冬酰胺(N72D)来移除重链可变域的框架中的潜在糖基化位点。基于以27%的出现率存在于胚系中的天冬氨酸来选择此突变。用苯丙氨酸(V27F)置换轻链的CDR1中的缬氨酸且产生具有增加的结合的分子。所得mAb,即4A19,展示与亲本9D7Ab类似的与表达CCR8的Raji细胞的结合(对于9D7及4A19,分别为10nM对比3nM)。

[0309] 表3. 代表性抗hCCR8 mAb的功能性表征数据

mAb	mAb的类型	免疫原
4A19	未经岩藻糖基化的人源化IgG1抗hCCR8	hCCR8 293F细胞(在3次免疫接种中, +KLH hCCR8-N-Sulf肽), 来自In-Cell-Art (Nantes, France) 的编码hCCR8的DNA
14S15 ^a	未经岩藻糖基化的嵌合小鼠-人 ^b 抗hCCR8	其产生不可检测的抗CCR8血清效价, 接着为KLH hCCR8-N-Sulf肽
18Y12	未经岩藻糖基化的嵌合小鼠-人 ^b 抗hCCR8	KLH hCCR8-N-Sulf肽
16B13	未经岩藻糖基化的人IgG1	hCCR8 BAF3质膜+KLH hCCR8-N-Sulf肽
2M18	人IgG1抗hCCR8	hCCR8 BAF3质膜+KLH hCCR8-N-Sulf肽
15C17	人IgG1抗hCCR8	CCR8 293质膜+KLH/BSA N-sulf-hCCR8肽
13T20	人IgG1抗hCCR8	CCR8 293质膜+KLH/BSA N-sulf-hCCR8肽
10R3	人IgG1抗hCCR8	hCCR8 BAF3质膜+KLH hCCR8-N-Sulf肽
8D55	人IgG1抗hCCR8	hCCR8 BAF3质膜+KLH hCCR8-N-Sulf肽
1V11	人IgG1抗hCCR8	hCCR8 BAF3质膜+KLH hCCR8-N-Sulf肽
11K16	人IgG1抗hCCR8	hCCR8 BAF3质膜+KLH hCCR8-N-Sulf肽
12F27	未经岩藻糖基化的嵌合物 ^c (mFc/hFab)	hCCR8 293质膜+KLH hCCR8-N-Sulf肽

^a本文中称为14S15的mAb系指小鼠抗hCCR8 mAb的嵌合衍生物,其中小鼠Fc区由nf IgG1人Fc置换。在此实施例中,如下文所描述产生此mAb的人源化、亲和力成熟及序列可靠性固定版本且称为14S15h。

^b这些mAb为包含移植至人Fc上的小鼠Fab的嵌合Ab。

^c在相对含义上,此mAb为嵌合Ab,因为其系在转基因小鼠中产生以包含小鼠Fc及完全人类Fab。这些小鼠经如此设计以产生包含用于帮助亲和力成熟的小鼠Fc的Ab。

[0310] 所产生的抗CCR8 mAb的代表性数目列举于表3中,其指示mAb的类型及用于产生其的免疫原。使用Expi293表达系统(Thermo Fisher Scientific),与hIgG1同型相同地以重组方式产生人类抗hCCR8 Ab。在Expi293Fut8^{-/-}细胞中表达Nf(hIgG1-nf) Ab。

[0311] 表3中的若干Ab,亦即,mAb 2M18、15C17、13T20、1V11、11K16及12F27为在筛选测定法(例如,CD16交联及Treg ADCC测定法)中效果不佳的Ab(相对较高的EC₅₀值及相对较低的

$Y_{\max}$ 值)且因此被视为无前景的治疗性候选物。然而,其包括于表3中以强调绝大部分所产生的CCR8结合性Ab未被视为强治疗性候选物的事实。

[0312] 将小鼠抗CCR8 MAbs人源化成14S15h MAbs

对另一种小鼠抗CCR8 mAb进行工程改造以将框架人源化成最近似的人类胚系序列(对于重链,其为hIgHV3-15且对于轻链,其为IGKV2-18)。框架的人源化引起人类Fab的结合降低,如通过SPR所测量(K_D 为4.2nM,相比之下,起始小鼠Ab,即9G10的KD为1.4nM)。使用3种不同的NNK库以及用来自Anaspec (Freemont, CA)的200nM、50nM、10nM及1nM生物素化CCR8N端肽在增加的洗涤严格性下进行的4轮淘选来进行重链可变域的亲和力成熟。重链CDR1区域中的N30G的单取代引起亲和力成熟。此外,通过使asn突变成gln(N28Q, Kabat编号)来移除Asn-Gly序列基序处的潜在去酰胺化位点。所得人源化、亲和力成熟的抗体及序列可靠性移除的14S15h具有完全复原且甚至增加的对CCR8N端肽的亲和力(对于14S15h Fab片段, K_D 为0.64nM)。本文中所描述的涉及14S15 mAb的测定法为此mAb的嵌合版本,如表3中所指示。

[0313] 实施例11

以高亲和力结合表达hCCR8的细胞的抗CCR8 mAb

抗hCCR8 MAbs与Treg的结合的 EC_{50} 值

将抗hCCR8 mAb与经活化的人Treg或表达人CCR8的细胞株(293F、CHO、Raji)一起培育。在存在100单位/毫升的重组人类IL-2的情况下,用抗CD3/CD28活化珠粒(ThermoFisher)刺激由预先经分离及扩增的Treg制备的经活化的Treg2天。自30 μ g/ml的起始浓度连续稀释Ab。应用适当的针对原发性抗CCR8 Ab的PE结合的二级Ab(Jackson ImmunoResearch),在4 $^{\circ}$ C下培育15分钟且接着进行洗涤。用流式细胞仪处理样品且使用Flowjo分析数据且展示于图11中。使用GraphPad Prism(GraphPad Software, La Jolla, CA)计算所选择的抗CCR8 mAb与经活化的Treg的结合的 EC_{50} 值。

[0314] 如图11中所示,所产生的抗CCR8 mAb的代表性样品呈现以某一范围内的亲和力结合各种经hCCR8转染的细胞株及经活化的Treg。通常最初基于Ab对表达CCR8的细胞株(CHO、293F、Raji)的结合亲和力来筛选Ab,且发现大部分所筛选的Ab呈现低于1nM的半最大有效浓度(EC_{50}) (图11A)。然而,当测试这些经预先筛选的Ab与经活化的Treg的结合时,观测到更广泛范围的结合亲和力,其中小于一半的Ab呈现以低于1nM的 EC_{50} 进行的结合(图11A)。具有在皮莫耳至奈莫耳范围内的 EC_{50} 值的所选择的Ab的子集呈现于图11B中,且相应的 EC_{50} 值提供于表4中。

[0315] 表4. 结合经活化的Treg的抗CCR8 mAb的亲和力(EC_{50})

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

[0316] 因为已证实抗hCCR8 mAb(包括18D55、10R3、14S15、16B13、4A19及18Y12)具有较高

的引发ADCC (实施例17) 或直接引发肿瘤浸润性Treg的有效消耗 (实施例19、20及22) 的潜力,显而易见的是,以nM范围内 (例如,约20nM或更低,但极限可较高,例如超过100nM) 的亲合力 (EC_{50}) 结合经活化的Treg上的CCR8的Ab可有效介导Treg消耗。然而,为了适用作特异性靶向肿瘤浸润性Treg的治疗剂,与CCR8的结合必须为高特异性的 (参考mAb 16B13,其以高亲和力结合CCR8,但亦强效结合非CCR8型目标 (实施例14))。

[0317] 抗CCR8 MAb,即4A19,与CCR8N端肽的结合的 K_D 值

通过表面等离子共振 (SPR) 来测量mAb 4A19与人CCR8的N端肽的结合的解离常数 (K_D)。在HBST缓冲液 (10mM HEPES (pH 7.4)、150mM NaCl、0.05% 1g/l的BSA) 中,在37°C下用Biacore T200进行SPR测量。用EDA (乙二胺) 阻断具有固定的抗人 κ 捕获pAb (Southern Biotech, Birmingham, AL) 的CM4芯片。捕获CCR8 Ab (Fab及mAb) 且在100微升/分钟的流动速率下历时2分钟注射CCR8N10端肽 (200nM、40nM、8nM或1.6nM) 作为分析物。所有数据经双重参考且使用Biacore T200评估软件版本3.1通过质量转移来针对1:1朗格缪尔结合模型 (Langmuir binding model) 进行拟合。通过Anaspec (Fremont, CA) 产生CCR8残基1-35未经硫酸化 (CCR8-无磺基)、在Tyr15处硫酸化 (CCR8-磺基Y15)、仅在Tyr17处硫酸化 (CCR8-磺基Y17) 或在位置Tyr15及Tyr17处硫酸化 (CCR8-2个磺基) 的肽。

[0318] 表5. 结合CCR8N端的抗CCR8 mAb (4A19) Fab片段的亲和力 (K_D)

MAb	配体	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
4A19	CCR8-2个磺基	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	粗略估计:		约 1.3×10^{-6}
4A19	CCR8-无磺基	未结合		

[0319] 表5中概述的结果表明4A19 Fab片段以1.6nM的 K_D 结合CCR8N端。磺基化酪氨酸系结合所需的,因为未经磺基化的肽未展示任何与4A19 Fab片段的结合。Y15上不存在磺基化 (CCR8-磺基Y17) 引起与经双重磺基化的肽相比亲和力降低约10倍,而Y17上不存在磺基化 (CCR8-磺基Y15) 引起4A19结合降低约1,000倍 (表5)。

[0320] 实施例12

结合CCR8N端肽的4A19的晶体结构

4A19 Fab与经单硫酸化的肽的结合

使4A19重链的Fab区 (V_H 及 C_{H1} 域) 与8His标签融合且选殖至pTT5载体中。在HEK细胞中表达包含此经修饰的4A19重链及4A19轻链的4A19 Fab片段。上清液经镍亲和管柱纯化,且将溶离液缓冲液交换至磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中且用含有10mM Tris pH 7.4、150NaCl的操作缓冲液在尺寸排阻管柱 (GE Superdex-200) 上设定尺寸。组合适当的主峰且浓缩至7-10mg/ml。通过Bio-Synthesis (Lewisville, TX) 以化学方式合成仅Y17经硫酸化的人CCR8的残基1-35。将冻干肽溶解于10mM Tris pH 7.4、150mM NaCl中且与4A19 Fab片段以5:1莫耳比混合。通过混合蛋白质溶液与相同份量的25%PEG3350来进行结晶且使用A1油防冻。在空间群C2中针对2.03 Å的分辨率对晶体进行绕射。所收集的数据使用XDS编索引,使用ccp4i进行按比例缩放及舍位且使用refmac5进行优化。

[0321] 图12A展示在2.03 Å分辨率下结合CCR8N端肽 (以杆状图展示) 的4A19 Fab片段的

晶体结构(以表面表示方式显示),表明由4A19结合的表位包含CCR8的残基15-21,该CCR8在其中心处具有硫酸化的酪氨酸-17。

[0322] 4A19 Fab与经双硫酸化的肽的结合

如先前章节中所描述产生4A19 Fab片段。通过Anaspec以化学方式合成由具有硫酸化的Y15及Y17的hCCR8的残基1-35组成的肽。将Fab片段缓冲液交换至50mM NaCl、10mM Tris pH 8.0中,且以2倍莫耳过量方式向Fab片段中添加经双硫酸化的肽。通过以12.8mg/ml混合200nl经浓缩的蛋白质样品与200nl母液(0.2M乙酸铵、20%PEG 3350,pH 7.2),在20℃下通过坐滴蒸汽扩散使晶体生长。晶体在7天内出现且用Advanced Photon Source,在光束线17-ID (IMCA-CAT)处在1.80 Å分辨率下收集x射线绕射数据。使用XDS在空间群P21中处理资料且用Phaser通过分子置换来测定结构且用Phenix进行优化。

[0323] 图12B展示结合CCR8N端肽(以杆状图展示)的4A19 Fab片段的晶体结构(以表面表示方式显示)。4A19Ab识别位置Y15及Y17处的两个tyr硫酸残基。使用PISA软件计算CCR8表位的分子相互作用。当与4A19 Fab片段复合时,CCR8残基V12、D14、Y(S03)15、Y16、Y(S03)17、P18、I20、F21及S22展示可及表面积的变化>3Å²。

[0324] 实施例13

抗mCCR8 MAbs与表达mCCR8的细胞的结合

抗CCR8-mIgG2a MAbs与表达mCCR8的CHO细胞的结合

将抗CCR8-mIgG2a(市售大鼠抗mCCR8 mAb[BioLegend克隆SA214G2]的小鼠IgG2a同型,本文中用作本文中所公开的引发ADCC的抗hCCR8治疗性Ab的替代物)自30μg/ml的起始浓度连续稀释且与 5×10^5 个表达mCCR8的CHO细胞一起培育。在培育之后,洗涤细胞且接着在冰上用抗小鼠IgG、PE结合的二级Ab(Jackson ImmunoResearch)染色30分钟。洗涤细胞且用流式细胞仪进行分析。使用Flowjo计算平均荧光强度。使用GraphPad Prism计算,测定EC₅₀为6.44nM。此显著高于以上分析的许多抗hCCR8 Ab的EC₅₀(对于与表达hCCR8的CHO细胞,其为约0.05nM)。

[0325] 抗CCR8 MAbs与小鼠胸腺细胞及原发性经活化的小鼠脾Treg的结合

通过流式细胞术来分析抗CCR8-mIgG2a与小鼠胸腺细胞及来自小鼠脾细胞的原发性经活化的Treg的结合。胸腺T细胞组成性表达CCR8,而在脾Treg上诱导CCR8表达。为了在小鼠脾细胞上诱导CCR8表达,分离CD4⁺ T细胞且用抗CD3/CD28珠粒(3:1比率)及2,000U/ml的重组小鼠重组IL-2(rIL-2)活化。将在同一天分离的胸腺CD4⁺ T细胞或活化48小时的CD4⁺脾T细胞与抗CCR8-mIgG2a或抗KLH-mIgG2a对照性Ab的滴定物混合。通过经荧光标记的抗小鼠IgG Ab侦测Ab与细胞表面CCR8的结合。以荧光方式结合的二级Ab的总CD4细胞阳性率方式测量相对细胞结合。

[0326] 证实抗mCCR8 Ab结合胸腺CD4⁺细胞(EC₅₀=4nM)及经活化的小鼠脾CD4⁺细胞(EC₅₀=6.16nM)的表面的CCR8。

[0327] 实施例14

不同抗hCCR8 MAbs的组织交叉反应

在1及3μg/ml下测试抗hCCR8 mAb(18Y12、16B13及4A19)与表达CCR8的细胞株、PBMC及不同组织类型的结合(对于各测试物,n=1-2)。

[0328] CCR8转染物

所有3种Ab皆强效结合经hCCR8转染的CHO及293F细胞株(资料未展示)。使用这些经转染的细胞株作为后续组织染色实验中的阳性对照物。

[0329] 正常人类PBMC

如图13A中所示,mAb 18Y12及4A19不结合PBMC。然而,16B13展示与非CCR8型目标的强效结合。尽管16B13展示有吸引力的特性,例如,以高亲和力结合经活化的Treg(实施例11)、有效抑制表达CCR8的细胞的钙通量(实施例15)及呈现高ADCC潜力或活性(实施例17及19),但在此mAb下观测到的与PBMC的非特异性结合指示其在疗法中的使用将存在除肿瘤浸润性Treg以外的不表达CCR8的细胞的脱靶消耗的问题。

[0330] 不同人类组织类型

针对18种正常人类组织类型的集合(包括大脑、小脑、心脏、肝脏、肺、肾脏、扁桃体、脾、胸腺、结肠、胃、胰腺、肾上腺、垂体、皮肤、外周神经、睾丸、子宫及PBMC涂片)测试mAb 18Y12及4A19(对于每种测试物,n=1-2),且使用表达hCCR8的CHO及293F细胞作为阳性对照物。

[0331] 在主要位于胸腺的髓质(图13B;18Y12-左侧小图及4A19-右侧小图)及皮肤的真皮(资料未展示)中的稀少及分散的免疫细胞中观测到阳性染色,而未在所检验的其他组织(数据未展示)中观测到阳性染色。在小鼠肿瘤模型中观测到类似表达概况(资料未展示)。

[0332] 针对21种正常人类组织类型的集合(包括大脑、小脑、心脏、肝脏、肺、肾脏、扁桃体、脾、胸腺、结肠、胃、胰腺、肾上腺、甲状腺、垂体、皮肤、外周神经、前列腺、睾丸、子宫及PBMC涂片)测试mAb 16B13(对于每种测试物,n=1-2),且使用经hCCR8转染的CHO细胞作为阳性对照物。

[0333] 在主要位于淋巴器官(胸腺[图13B;中间小图]、扁桃体、脾)及富含淋巴的组织(结肠及小肠;资料未展示)中的免疫细胞中观测到最明显的染色。染色为强烈的且在绝大部分免疫细胞中,特定地,富含淋巴细胞的区域中扩散(例如,与脾中的红髓相比,白髓中的染色明显更强烈),其中主要为细胞质和/或核周模式。在许多其中存在免疫细胞(包括肝脏中的库氏细胞(Kupfer cell)、肺中的肺泡巨噬细胞及肾脏的肾小球中的肾小球膜样细胞)的组织中观测到此染色。

[0334] 在PBMC涂片中,在未经固定(但经风干)的涂片中未观测到或观测到最小染色,而在丙酮固定(亦即,透性化)的载玻片中发现核周细胞质染色,其进一步支持阳性标记系在细胞内发生的观测结果。

[0335] 亦在内脏(小肠、结肠、胃)中的肌层中的平滑肌细胞、皮肤中的立毛肌及前列腺的基质以及大部分组织中的血管结构中观测到强烈及弥漫性染色(主要在较高的3 μ g/ml浓度下)。染色呈现细胞质模式。

[0336] 在大脑及小脑中的神经元及胶细胞以及神经垂体中的细胞的子集及外周神经中的纺锤体间质性细胞中显示强烈及弥漫性核周和/或细胞质染色。

[0337] 亦在上皮细胞的子集(包括心脏中之间皮、肾脏中的远端或集合小管上皮的子集、垂体中的内分泌细胞、肺中的呼吸道上皮细胞、胰腺中的导管上皮、睾丸中的输精管上皮的基底层及子宫的子宫内膜中的腺体上皮)中观测到强烈及弥漫性细胞质染色。在大多数情况下,染色倾向于在高浓度(3 μ g/ml)下更加明显。

[0338] 实施例15

抗hCCR8 MAb阻断hCCL1与表达hCCR8的细胞的结合

通过对表达hCCR8的CHO细胞 (hCCR8-CHO) 进行钙 (Ca) 通测量定法来测试抗hCCR8 mAb阻断hCCL1与hCCR8的结合, 因为CHO细胞上的CCR8的CCL1接合诱导钙通量。将hCCR8-CHO接种且在存在FLIPR Calcium 6染料 (Molecular Devices) 及丙磺舒 (probenecid) (Thermo Fisher Scientific) 的情况下, 在37℃下培育2小时。在培育之后, 向细胞中添加不同的抗CCR8 mAb且在室温下静置15分钟, 接着添加10nM重组人类CCL1 (R&D Systems, Minneapolis, MN)。使用FLIPR Tetra系统 (Molecular Devices) 通过最大-最小准则 (Max-Min) 来测量Ca通量荧光信号。使用GraphPad Prism计算半最大抑制浓度 (IC_{50})。

[0339] 表6. 由抗CCR8 mAb进行的表达CCR8的细胞上的钙通量的阻断

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

[0340] 阻断CCL1与CCR8的结合的能力可对Treg具有抗抑制作用, 且使用此功能作为选择抗CCR8治疗性Ab候选物的选择准则。约52%的 (96种中的50种) 所测试的抗hCCR8 mAb阻断hCCR8-CHO细胞上的CCL1结合 (图14A)。所选择的这些Ab的子集阻断CCR8-CHO细胞的CCL1诱导的Ca通量达51% - 94% (图14B)。在图14C中展示4种所选择的抗CCR8 mAb进行的hCCR8-CHO上的Ca通量的阻断的 IC_{50} 曲线 (IC_{50} 范围为0.23nM至1.331nM), 且这些mAb的 IC_{50} 值展示于表6中。

[0341] 实施例16

抗mCCR8 MAb阻断mCCL1与表达mCCR8的细胞的结合

除了使用表达mCCR8的CHO细胞 (mCCR8-CHO) 代替hCCR8-CHO以外, 通过如实施例15中所描述对mCCR8-CHO进行Ca通测量定法来测试由抗CCR8-mIgG2a进行的mCCL1与mCCR8的结合的阻断。使用GraphPad Prism计算, 测定 IC_{50} 为19.34nM。

[0342] 为了使抗CCR8-mIgG2a充当适当的小鼠替代性Ab以用于测试经设计以用于人类使用的抗CCR8 Ab的治疗功效, 重要的是, 此小鼠Ab呈现与其hCCR8 Ab对应物类似的功能特性。与抑制hCCL1诱导的Ca通量的抗hCCR8 mAb类似 (图14, 表6), 发现抗CCR8-mIgG2a抑制mCCR8-CHO细胞中的mCCL1诱导的约通量, 但有效性较低, 其中 IC_{50} 值为19.34nM, 相比之下, 在实施例15中测试的抗hCCR8 Ab的所观测的 IC_{50} 值为约0.2nM至1.3nM。

[0343] 实施例17

通过进行CD16交联的能力测量的抗hCCR8 MAb的ADCC潜力

通过抗hCCR8 mAb介导CD16表达报道细胞的交联的能力来测量这些Ab的ADCC潜力。经活化的人Treg或表达hCCR8的Raji细胞与表达CD16的Jurkat NFAT荧光素酶报道细胞以1:5比率在存在抗CCR8 Ab或对照性Ab的情况下, 在37℃下共同培养4小时。向细胞中添加BIO-GLO™ (Promega, Madison, WI) 且在室温下培育5分钟, 且接着读取发光以用于测量荧光素酶活性。使用GraphPad Prism计算半最大有效浓度 (EC_{50})。

[0344] NK细胞经由Fc- γ 受体3A (CD16) 的接合或交联来介导ADCC。如上文所描述,通过表达CD16的细胞株来测量抗hCCR8 mAb介导目标细胞(表达hCCR8的Raji细胞或经活化的人Treg)的ADCC的能力。在以表达CCR8的Raji细胞作为目标的情况下,百分的十六的所测试的具有人IgG1 (hIgG1) 主链的抗hCCR8 mAb呈现80-100%的最大CD16接合(图15A)。将所选择的mAb修饰成nf hIgG1格式(hIgG1-nf) 且以相同方式筛选。

[0345] 表7. 由抗CCR8 mAb进行的CD16表达报道细胞的交联

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] 大多数这些抗CCR8 hIgG1-nf mAb实现80-100%CD16交联(图15A)。在经活化的人Treg作为目标细胞的情况下,百分的二十七的所测试的抗CCR8 hIgG1-nf mAb实现最大CD16接合(图15A)。所测试的所选择的抗hCCR8 hIgG1-nf mAb的集合的CD16交联能力的EC₅₀值展示于图15B及表7中。

[0347] 实施例18

通过进行小鼠Fc γ IV4⁺报道细胞的交联的能力测量的抗mCCR8 mAb的ADCC潜力

通过测量抗CCR8-mIgG2a诱导小鼠Fc γ RIV⁺报道细胞(Promega)的交联的能力来间接评估其诱导ADCC介导的表达CCR8的细胞的杀伤的能力。在此测定法中,将表达萤火虫荧光素酶的Fc γ RIV⁺效应细胞与来自小鼠脾细胞的原发性经活化的Treg或表达mCCR8的CHO细胞以1:5比率共同培养。细胞在存在抗CCR8-mIgG2a、具有惰性主链的抗CCR8-mIgG1-D265A或抗KLH-mIgG2a对照性Ab的滴定物的情况下,在37℃下共同培养4小时。以Fc γ RIV⁺效应细胞的交联及活化形式测量目标细胞杀伤活性,该交联及活化展示在细胞与BIO-GLO™ (Promega) 荧光素受质一起培育时产生的生物发光信号(RLU)的增加。

[0348] 在抗CCR8-mIgG2a的较高浓度下,观测到效应细胞的特异性交联(EC₅₀=6.34nm),由高荧光素酶信号证明。此表明Ab结合目标细胞且与效应细胞中的Fc γ RIV接合。使用非目标特异性Ab(抗KLH-mIgG2a)及非Fc γ RIV接合性Ab(抗CCR8-mIgG1-D265A)(其皆不展示任何荧光素酶信号传导)评估此相互作用的特异性。

[0349] 实施例19

抗CCR8 MAb促进NK细胞介导的Treg的细胞毒性

测试呈现增强的效应功能的未经岩藻糖基化的抗hCCR8 mAb促进NK细胞介导的经活化的Treg细胞(如实施例2中所描述制备)的细胞凋亡的能力。使用PBMC的Ficoll梯度分离自全血分离用作效应子的同种NK细胞,接着进行磁珠阴性选择(Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA)以移除非NK细胞。自新鲜的健康供体PBMC(人类NK细胞分离试剂盒, Miltenyi Biotec)分离NK细胞且在具有1pM氢化可的松(hydrocortisone)(StemCell Technologies)及500U/ml的重组人类IL-2(PeproTech, Cranbury, NJ)的Myelocult H5100培养基(StemCell Technologies)中培养24小时以增加NK细胞活化。

[0350] 将NK细胞用CellTrace Violet (Thermo Fisher Scientific) 进行荧光标记且在具有10%超低IgG FBS及1mM丙酮酸钠的RPMI培养基中与Treg细胞以5:1的比率组合。添加抗hCCR8 Ab及同型对照性Ab的滴定物且与细胞一起在37℃下培育3小时。在含有Ca²⁺的缓冲液中用磷脂结合蛋白-V FITC结合的Ab及7-AAD将细胞染色且使用BD Fortessa X-20细胞计数器(BD Biosciences, San Jose, CA) 通过流式细胞术来测量细胞荧光。经由标准流式细胞术分析来测定全部Treg中的细胞凋亡Treg (磷脂结合蛋白-V阳性, CellTrace Violet阴性) 的百分比。

[0351] 使用在存在抗hCCR8-hIgG1-nf mAb的情况下, 由同种异体NK细胞引起的经活化的人Treg的ADCC以评估抗CCR8 Ab介导肿瘤浸润性Treg的消耗的能力。在经由CCR8结合 (实施例9)、CCL1阻断 (实施例15) 及CD16交联测定法 (实施例17) 筛选更大的抗hCCR8 Ab集合之后, 评估Ab的子集经由NK细胞介导经活化的Treg的ADCC的能力。经历由所选择的抗hCCR8-hIgG1-nf Ab诱导的细胞凋亡的细胞的中值百分比描绘于图16中, 表明这些在约34%至99%范围内。由不同的抗CCR8 Ab介导的由同种异体NK细胞引起的经活化的Treg的杀伤的EC₅₀值展示于表8中, 其中值在约13pM至304nM范围内。

[0352] 表8. 由抗CCR8 mAb介导的经活化的Treg的ADCC杀伤

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] 实施例20

抗CCR8 MAb促进患者肿瘤中的Treg的消耗

测试未经岩藻糖基化的抗hCCR8 mAb促进NK细胞介导的来自人类患者的肿瘤Treg的细胞凋亡的能力。简言的, 自Discovery Life Sciences购得经解离的患者子宫内膜肿瘤。分离来自健康供体的NK细胞且如实施例19中所描述进行预致敏隔夜以用于ADCC且进行荧光标记(CellTrace Violet, ThermoFisher)。接着, 将这些NK细胞 (1.875 × 10⁵个细胞/孔) 与子宫内膜肿瘤细胞 (2.5 × 10⁵个细胞/孔) 以及抗hCCR8 (14S15) 及对照性Ab (抗CCR4 mAb、莫格利珠单抗及抗KLH-nf同型) 的滴定物一起在具有10%超低IgG FBS及1mM丙酮酸钠的RPMI培养基中, 在37℃下培育24小时。针对Treg及其他淋巴细胞群体将所得细胞染色且经由流式细胞仪进行处理。使用Flowjo软件分析Treg及常规T细胞出现率。

[0354] 为了测定抗hCCR8 Ab是否可特异性介导患者肿瘤浸润性Treg的ADCC, 将同种异体NK细胞与经消化的含有肿瘤浸润性Treg的子宫内膜肿瘤细胞共同培养。先前已证实莫格利珠单抗、抗CCR4-hIgG1nf Ab可介导癌症患者中的Treg杀伤。如图17中所示, 莫格利珠单抗及抗CCR8 mAb, 即14S15, 皆诱导肿瘤Treg杀伤, 其中14S15更有效 (图17A)。mAb 14S15特异性消耗子宫内膜肿瘤Treg (图17A), 但不消耗常规CD4⁺FOXP3⁻ T细胞 (图17B)。相比之下, 莫格利珠单抗亦消耗常规CD4⁺FOXP3⁻ T细胞。14S15不消耗任何其他淋巴细胞子集 (数据未展

示)。

[0355] 在另一实验中,产生若干种具有以下人类重链变异体的针对hCCR8的Ab:1) hIgG1; 2) nf IgG1 (IgG1-nf), 其与IgG1相比呈现明显更高的Fc γ R结合亲和力且可胜过内源性IgG以结合CD16,从而引起ADCC/ADCP (Iida, 2006); 及3) IgG1-L234A-L235E-G237A (hIgG1-惰性), 其最低程度地接合Fc γ R (Hezareh et al., 2001)。作为IgG1-nf Ab的抗人CCR8克隆16B13及14S15在体外结合经活化的人类FOXP3⁺ Treg, 阻断CCL1结合且在结合经活化的Treg上的CCR8时与CD16交联(实施例11、15及17; Campbell等人, 2021, 其中将16B13称为CCR8.1且将14S15称为CCR8.2)。克隆16B13-IgG1亦能够与CD16交联, 但效能低于其IgG1-nf对应物 (Campbell等人, 2021), 而16B13-IgG1-惰性完全不能介导CD16交联 (Campbell等人, 2021)。

[0356] 接着测定抗hCCR8-IgG1-nf Ab消耗来自外周血液及原发性人类肿瘤样本的FOXP3⁺ Treg的能力。通过在U形底96孔盘 (Corning) 中, 在培养基及100U/ml的IL-2 (Peprotech) 中, 将 2.0×10^5 个PBMC在37℃下培育48小时来进行PBMC消耗测定法。在两天之后, 添加相关Ab且再培育细胞96小时, 接着进行流式细胞分析。

[0357] 尽管14S15-IgG1-nf消耗外周血液Treg的子集(小于50%) (图18A), 但nf抗人CCR4 Ab (抗hCCR4-IgG1-nf, 莫格利珠单抗生物类似物) 移除超过90%的这些细胞(图18A) 以及约一半的外周CD4⁺ Tconv (图18B)。两种Ab皆不影响CD8⁺ T细胞群体(图18C)。因此, 用抗hCCR8-IgG1-nf Ab处理经活化的PBMC可消耗外周血液Treg的子集, 但重要的是, 不消耗Teff细胞。在乳腺癌患者中, TCR测序公开外周血液CCR8⁺ Treg与肿瘤Treg之间的显著克隆重迭 (Wang等人, 2019), 表明: (1) 来自外周的Treg克隆移转至肿瘤中且扩增且引起Treg抑制, 或 (2) 来自肿瘤微环境的经活化的Treg扩增至外周中。两种情形可同时发生且引起循环性CCR8⁺ Treg浸润至肿瘤转移性位点中以介导免疫抑制。与机制无关, 这些结果表明CCR8⁺ Treg的成批消耗可充当全身性移除外周或肿瘤中的肿瘤特异性Treg的方法。

[0358] 为了测试离体肿瘤样品中的抗CCR8介导的消耗, 将NSCLC手术切除物的细胞悬浮液与来自健康供体血液的经活化的同种异体NK细胞一起培养。添加14S15-IgG1-nf可引起FOXP3⁺ Treg的出现率降低(图18D), 而对整体CD4⁺ Tconv (图18E) 或CD8⁺ T细胞出现率(图18F) 无任何影响。相比之下, 除消耗Treg (图18D) 以外, 抗hCCR4-IgG1-nf亦消耗约30%的CD4⁺ Tconv (图18E)。在用16B13-IgG1-惰性进行的治疗之后未观测到Treg消耗(图18G)。

[0359] 测试在不存在同种异体NK细胞的情况下, 16B13-IgG1-nf及4A19消耗离体患者肿瘤样品中的Treg的能力。对于16B13研究, 将新鲜的透明细胞肾细胞癌(RCC) 及胃肿瘤组织包覆于琼脂中且使用COMPRESSTOME® 振动薄片切片机 (Precisionary 仪器; Greenville, NC) 制备连续的300 μ M厚的薄片直至将所有肿瘤组织切片。在含有5ml RPMI 1640细胞培养基 (Corning) 及补充有1mM丙酮酸钠及55nM 2-巯基乙醇的10%FBS (Thermo Fisher Scientific) 的6孔组织培养盘中, 在两片胶原蛋白止血剂 (Becton Dickinson, Warwick, RI) 之间培养组织切片。在80rpm下旋转的盘振荡器上, 在37℃下培育切片培养物以促进培养基灌注。在24小时之后, 用16B13-IgG1-nf或抗KLH-nf hIgG1同型对照物处理切片培养物孔。在与mAb一起培育3天之后, 使用试剂盒 (Miltenyi Biotec) 将肿瘤组织切片以酶促方式解离成单细胞悬浮液且染色以用于流式细胞术分析。测定CD4⁺ T细胞中的FOXP3⁺ Treg的百分比。

[0360] 如图18H及18I中所示,在不添加同种异体NK细胞的离体患者肿瘤切片培养物系统中,用16B13-IgG1-nf处理肾细胞及胃肿瘤使Treg细胞的出现率降低约50%,证实内源性肿瘤驻留Fc γ R⁺细胞足以现场介导针对CCR8⁺目标细胞的ADCC/ADCP。

[0361] 对于4A19研究,将经切除的黑素瘤肿瘤切片且与10 μ g/ml的4A19、莫格利珠单抗生物类似物或抗KLH-nf hIgG1同型对照物一起培养3天。在3天之后,将经处理的肿瘤切片解离成单个细胞悬浮液以用于流式细胞术分析。总体而言,当与用莫格利珠单抗生物类似物及同型处理的切片相比时,用4A19处理的肿瘤切片展示降低的FOXP3⁺ CD4⁺ Treg的百分比。

[0362] 实施例21

抗CCR8 MAb不诱导CCR8的细胞内化

为了测定抗CCR8 Ab在结合细胞表面上的CCR8时是否诱导CCR8受体的内化,如实施例2中所描述将Treg活化。向4 $\times$ 10⁴个经活化的Treg中各自以10 μ g/ml的浓度添加抗CCR8 mAb (4A19)、阳性对照性Ab (抗ICOS Ab) 及同型对照物且在37 $^{\circ}$ C下培育5个时段:0、30、60、90及120分钟。此外,以5 μ g/ml向样品的子集中添加山羊抗人Fc γ Ab以使原发性Ab交联。在各时段之后,向Treg中添加迭氮化钠溶液且将混合物置放于冰上以防止进一步受体内化。最终,所有样品用0.05%迭氮化钠溶液洗涤两次,接着用适当的藻红素 (PE) 结合的二级Ab染色。用2%多聚甲醛 (PFA) 将细胞固定,接着用细胞计数器进行分析。通过如使用Flowjo软件测定的中值荧光强度来测量细胞表面上的CCR8表达量。

[0363] 如图19中所示,抗ICOS mAb在不存在交联Ab的情况下在120分钟时段内引起最小的ICOS内化,但在存在交联Ab的情况下引起显著的ICOS内化。相比之下,抗CCR8mAb,即4A19,在存在或不存在交联Ab的情况下皆不引起CCR8的内化。在存在或不存在交联二级Ab的情况下用同型Ab处理经活化的Treg皆不引起CCR8的内化。

[0364] 实施例22

在体外人类肿瘤Treg的消耗

分离供体自然杀伤(NK)细胞且使用Myelocult H5100 (StemCell)、1pM氢化可的松及500U/ml的IL-2 (PeproTech) 活化24小时。将冷冻的经解离的人类肺腺癌组织 (Discovery Life Sciences) 解冻且在存在抗hCCR8 (mAb 4A19)、抗hCCR4 hIgG1-nf (莫格利珠单抗生物类似物) 或对照性nf钥孔血蓝蛋白 (KLH-nf) mAb的情况下,以1:1比率与2.5 $\times$ 10⁵个同种异体NK细胞共同离体培养24小时。将细胞染色且使用Flowjo软件通过流式细胞术来测量Treg消耗以计算细胞群体。

[0365] 如图20中所示,mAb 4A19诱导可测量的肿瘤Treg的消耗而不影响Teff的出现率或数目。此在用经消化的患者肿瘤及患者肿瘤切片外植体系统进行的同种异体NK杀伤测定法中得到证实。与抗CCR4-nf Ab相比,mAb 4A19更有效地实现在体外Treg消耗(图20A)。此外,与抗CCR4-nf Ab相比,mAb 4A19不诱导CD4⁺效应T细胞的消耗(图20B)。抗CCR8或抗CCR4皆不消耗CD8⁺效应T细胞(图20C)。

[0366] 具有无关靶向臂(抗KLH-nf)或惰性主链(抗CCR8-惰性)的Ab不消耗Treg,表明Treg消耗需要目标介导的经由nf主链进行的Fc γ R接合(图20D)。

[0367] 实施例23

抗CCR8 MAb降低CT26小鼠肿瘤模型中的肿瘤生长

使用多种小鼠肿瘤模型(亦即,同基因型CT26、MC38及SA1N模型,以及对抗PD-1治

疗具有抗性的肿瘤模型MB49及4T1) 测试抗CCR8 mAb的作用。以200微克/小鼠进行所有Ab处理且在所有研究中每周两次测量肿瘤。

[0368] 在CT26小鼠结肠腺癌模型中评估抗mCCR8 mAb (抗CCR8-mIgG2a) 的抗肿瘤活性。将十五周龄雌性BALB/cAnNHsd小鼠各自皮下植入(SC) 10^6 个CT26肿瘤细胞。在肿瘤植入后第7天,当肿瘤达到约 100mm^3 的中值尺寸时,以10只小鼠/组将小鼠随机分配至处理组中。在植入后第7、10及14天,经由IP注射以 $200\mu\text{l}$ 的体积,以 $200\mu\text{g}$ /小鼠施用在PBS中调配的Ab (抗CCR8-mIgG2a或对照性mIgG2a同型Ab)。记录肿瘤体积、体重及临床观测结果以确定测试药剂的功效及耐受性。使用以下等式将肿瘤测径器测量结果转换为肿瘤体积:体积=1/2(长度×宽度×高度)。每周记录肿瘤测量结果两次直至植入后第35天。在研究时,小鼠随意取食无菌啮齿动物食物及水且在12小时照明/黑暗循环下圈养于具有顶部无菌过滤器的笼子中。根据国际实验动物护理评估及认可委员会 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) 的指南进行所有小鼠实验。

[0369] 数据表明抗CCR8-mIgG2a有效降低肿瘤生长的速率,其中10只小鼠中的8只在植入后第28天不具有肿瘤,而用对照性mIgG2a Ab进行的处理不抑制肿瘤生长(图21A)。对于在小鼠肿瘤模型中进行的实验,在Ab的最后一次给药之后针对肿瘤复发来监测无肿瘤小鼠>25天。经对照物处理的小鼠的测量在肿瘤植入后约35天之后停止,随后处死其余小鼠。经处理的小鼠的平均肿瘤体积展示于图21B中,其证实抗CCR8 mAb对肿瘤生长的强效抑制及用同型对照物处理的肿瘤的不受抑制的生长。这些数据表明抗CCR8 Ab在此CT26小鼠模型中极有效地抑制肿瘤生长且与肿瘤浸润性Treg的消耗相关联。

[0370] 对于肿瘤浸润性淋巴细胞的分析,在植入后第16天收集小鼠肿瘤。用胶原蛋白酶消化肿瘤,使用OctoMacs解离器(Miltenyi Biotech)以机械方式解离且经由无菌 $100\mu\text{M}$ 滤器过滤。通过与FcR阻断剂(Miltenyi Biotech)一起培育来将样品针对Fc受体进行阻断,接着针对淋巴细胞群体进行表面染色,固定,透性化及针对Foxp3进行细胞内染色。接着,洗涤细胞且经由流式细胞仪处理。使用FlowJo软件进行分析且使用GraphPad Prism绘图。

[0371] 如图21C中所示,与用同型对照物处理的小鼠相比,用抗CCR8-mIgG2a处理携带CT26肿瘤的小鼠可显著降低 CD4^+ T细胞群体中的Foxp3⁺ Treg的百分比,而脾中的Treg群体不受用抗CCR8-mIgG2a进行的处理影响(图21D)。这些数据表明CCR8在肿瘤相关Treg的表面上特异性表达,但不在外周Treg上表达且此外,Ab与CCR8的结合可介导通过ADCC进行的肿瘤相关Treg的消耗。

[0372] 实施例24

抗mCCR8仅介导肿瘤Treg的消耗,避开正常组织中的CCR8⁺ T细胞

在CT26小鼠结肠腺癌模型中评估鼠类组织淋巴细胞群体。向雌性BALB/C小鼠皮下注射 10^6 个CT26肿瘤细胞。在12天之后,当通过测径器测量的肿瘤体积达到约 $100\text{--}150\text{mm}^3$ 时,根据肿瘤尺寸将小鼠随机分配至处理组中。在植入之后第12、14及19天,向小鼠3次施用 $200\mu\text{g}$ 平剂量(对于平均体重为 21.2g 的小鼠,约 10mg/kg)的抗CCR8-mIgG2a或mIgG2a同型对照性mAb。在第20天,在第三次Ab给药之后24小时,将小鼠处死,收集血液样品且切除肿瘤、皮肤、脾及胸腺组织。

[0373] 将组织处理成单细胞悬浮液以用于流式细胞术。将肿瘤切碎且以酶促方式消化,以机械方式解离脾及胸腺组织且如实施例2中所描述来消耗经解离的脾及血液样品中的

RBC。通过与FcR阻断剂(Miltenyi Biotech)一起培育来将来自经处理的组织的细胞悬浮液针对Fc受体进行阻断,接着针对淋巴细胞群体进行表面染色,固定,透性化及针对Foxp3进行细胞内染色。接着,洗涤细胞且经由流式细胞仪处理。使用FlowJo软件进行分析且使用GraphPad Prism将结果绘图。

[0374] 在浸润小鼠CT26肿瘤的T细胞中,与FOXP3⁻CD4⁺效应子(CD4^{eff})或CD8⁺T(CD8T)细胞相比,CD4⁺FOXP3⁺Treg(Treg)具有最多的CCR8表达(图22A)。亦在皮肤驻留T细胞群体上观测到CCR8表达,脾或血液中的T细胞上的表达极少(图22A)。在胸腺中,CCR8表达于CD4⁺CD8⁻(单阳性)胸腺细胞的子集上(图22B)。在用抗CCR8-mIgG2a处理之后,消耗肿瘤浸润性Treg,而不消耗脾、血液及皮肤中的Treg(图22C)。亦不影响胸腺细胞(图22D)以及皮肤中的CD4⁺(图22E)及CD8⁺(图22F)T细胞。因此,在小鼠CT26肿瘤模型中,用抗mCCR8消耗性Ab进行的处理选择性地消耗肿瘤中的CCR8⁺Treg,但不消耗皮肤、胸腺、脾或血液中的相对较低数目的CCR8⁺T细胞。

[0375] 实施例25

抗CCR8 MAb降低MC38小鼠肿瘤模型中的肿瘤生长

在MC38小鼠结肠腺癌模型中测量抗CCR8-mIgG2a的抗肿瘤活性。向十五周龄雌性FOXP3_IRES-EGFP(C57BL/6)小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)各自SC植入10⁶个MC38肿瘤细胞且肿瘤植入后第7天以10只小鼠/组随机分配至处理组中。在植入后第7、10及14天,经由IP注射以200μl的体积,以200微克/小鼠施用Ab(抗CCR8-mIgG2a或对照性mIgG2a Ab)。每周两次记录肿瘤测量结果直至植入后第51天,随后处死小鼠。使用GraphPad Prism进行数据分析及绘图。

[0376] 数据表明抗CCR8-mIgG2a有效降低肿瘤生长速率,其中10只小鼠中的7只在植入后第51天具有小于10mm³的肿瘤体积,相比之下,展示不受抑制的生长的肿瘤的平均体积超过1,100mm³,而用对照性mIgG2a Ab进行的处理不抑制肿瘤生长(图23A)。经处理的小鼠的平均肿瘤体积展示于图23B中,其证实抗CCR8-mIgG2a对肿瘤生长的强效抑制及用同型对照物处理的肿瘤的不受抑制的生长。这些数据表明抗CCR8 Ab在此MC38小鼠模型中极有效地抑制肿瘤生长。

[0377] 实施例26

MC38小鼠肿瘤模型中对抗CCR8 MAb处理的药效学及药物动力学反应

向C57BL/6小鼠SC注射1.0×10⁶个MC38细胞。用测径器以二维方式测量肿瘤且肿瘤体积计算为L×(W²/2),其中L=长度(2个测量结果中的较长者)且W=宽度。当平均肿瘤体积达到约77mm³时,将小鼠随机分为6个组,每组25只小鼠(21只小鼠用于同型对照),且在植入后第10天,以表9中展示的剂量,通过IP注射来施用在PBS中稀释的抗CCR8-mIgG2a或mIgG2a同型对照物。针对体态、整毛及呼吸变化以及嗜睡每天检查小鼠。每周至少两次记录肿瘤及组体重直至死亡、处死或研究时段结束。若肿瘤体积达到大于约2,000mm³或出现溃疡,则将动物处死。

[0378] 为了研究抗mCCR8 mAb对肿瘤浸润性淋巴细胞的作用,在处理第3、5及10天收集肿瘤(n=7只小鼠/处理组)。使用gentleMACS C试管获得来自肿瘤的单细胞悬浮液。使细胞悬浮液通过70μm过滤器,接着进行粒化。在再悬浮之后,使用Vi细胞计数器(Beckman Coulter,Miami,FL)对细胞进行计数。接着,以3.0×10⁶个细胞/孔将细胞涂布于96孔盘中

且使用流式细胞术Ab针对免疫细胞子集及功能性标志物进行染色。用Fortessa X-20细胞计数器(BD Biosciences)通过流式细胞术来检测Ab荧光且使用FlowJo软件分析结果。

[0379] 为了评估抗mCCR8 mAb的药物动力学(PK),在给药后4、24、72、120、168及240小时通过尾部血或末端血来获得全血样品($n=4$ 只小鼠/时间点)。使血液样品凝固且在4℃下离心($1,500$ 至 $2,000\times g$)以获得血清。将血清样品储存于-80℃下直至分析。使用免疫捕获LC-MS/MS分析小鼠血清样品以用于检测抗mCCR8 mAb。使用参考材料制备校准物及质量对照样品。抗mCCR8 mAb校准曲线的范围对于小鼠血清中的200至200,000ng/ml。定量的上限及下限分别为200,000及200ng/ml(亦即,ULOQ 200,000ng/ml, LLOQ 200ng/ml)。使用Phoenix WinNonlin软件(Certara, Menlo Park, CA),通过血清浓度与时间数据的非分室分析来获得PK参数。使用线性及对数梯形求和的组合来计算自时间零至最后一次采样时间的曲线下面积[AUC (0- T)]及自时间零至无穷的曲线下面积[AUC (INF)]。在IP给药之后估计CLT Vss及 $T_{1/2}$ 。特定地,CLT为药物的总清除率且Vss为(药物)的稳态分布体积。使用最少3个端点时间点及可定量的浓度进行半衰期($T_{1/2}$)的估计。

[0380] 与实施例25中的结果一致,用单次剂量的抗mCCR8 mAb进行的处理在MC38模型中引起降低的肿瘤生长。在处理第10天,平均肿瘤体积系如图24A及表9中所示。

[0381] 表9. 由抗CCR8 mAb介导的经活化的Treg的ADCC杀伤

组	Ab处理(剂量)	第10天时的肿瘤体 积(mm^3)	Treg百分比	CD8 ⁺ T细胞百 分比
1	对照物(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模型中的免疫表型分型研究进一步表明抗mCCR8以剂量依赖性方式诱导Treg消耗。在处理第5天,在0.03及0.1mg/kg的较低剂量下用抗mCCR8处理的小鼠中的平均Treg百分比($\pm$ SD) (Foxp3⁺/CD4⁺ T细胞百分比)保持与经同型对照物处理的组类似(参见图24B;表9)。

[0383] 在处理第5天,与经同型对照物处理的组相比,经抗mCCR8 mAb处理的组中的肿瘤浸润性CD8⁺ T细胞的出现率(%)增加,如图24C;表9中所示。

[0384] 抗CCR8-mIgG2a的单一IP剂量在0.03至3mg/kg的剂量范围内显示非线性PK,表明目标介导的药物处置(TMDD)。与0.3mg/kg剂量相比, $T_{1/2}$ 与1及3mg/kg剂量的 $T_{1/2}$ 相比增加约三倍(图24D)。

[0385] 实施例27

抗CCR8及抗PD-1mAb在MB49小鼠膀胱癌肿瘤模型中协同降低肿瘤生长

在已知对抗mPD-1单药疗法的反应较低的MB49鼠类膀胱癌模型中以单一药剂或与抗mPD-1 Ab(克隆4H2)的组合形式测量抗CCR8-mIgG2a的抗肿瘤活性。亦用对照性mIgG2a Ab或单独的4H2处理小鼠。抗mPD-1克隆4H2为由大鼠IgG2a抗小鼠PD-1 Ab构筑的嵌合大鼠-小鼠抗mPD-1 mAb,其中Fc部分由来自小鼠IgG1同型的Fc部分置换以产生具有降低的与小鼠FcR的结合的mAb(Li等人,2009)。其阻断mPD-L1及mPD-L2与mPD-1的结合,刺激T细胞反应

且在小鼠中呈现抗肿瘤活性,且系如先前所描述来产生(Li等人,2009)及在CHO细胞中表达。

[0386] 向十五周龄雄性C57BL/6 Foxp3-IRES-EGFP小鼠SC注射 2×10^5 个MB49肿瘤细胞且在肿瘤植入后第9天随机分配至处理组中,每组10只小鼠。在植入后第10、13及18天经由IP注射以200微克/小鼠施用mAb。每周两次记录肿瘤测量结果直至第39天,随后处死小鼠。

[0387] 对于肿瘤浸润性淋巴细胞的分析,在植入后第17天收集小鼠肿瘤。用胶原蛋白酶消化肿瘤,使用OctoMacs解离器(Miltenyi Biotech)以机械方式解离且经由无菌100 μ M滤器过滤。用FcR阻断剂针对Fc受体来阻断样品,接着针对淋巴细胞群体进行表面染色。接着,洗涤细胞且经由流式细胞仪处理。使用FlowJo软件进行分析且使用GraphPad Prism绘图。

[0388] 如图25A中所示,单药剂抗CCR8及抗PD-1处理在小鼠MB49肿瘤模型中诱导部分抗肿瘤活性,其中抗CCR8 mAb的作用强于抗PD-1 mAb。然而,抗CCR8及抗PD-1 mAb的组合给药具有协同作用,其几乎完全抑制肿瘤生长,引起10只小鼠中的8只不具有肿瘤。此表明在低免疫原性肿瘤模型中,抗PD-1处理可以协同方式增强抗CCR8的抗肿瘤活性。若Ab的组合的抗肿瘤作用大于由各Ab个别地呈现的抑制水平的总和,则认为该组合具有协同性。

[0389] 图25B展示在各种Ab处理之后,肿瘤相关CD4⁺ T细胞(其为Treg)的百分比。尽管抗CCR8单一药剂及抗CCR8/抗PD-1组合处理的肿瘤Treg的消耗量类似,但单药剂抗CCR8治疗组在抑制肿瘤生长方面不足。

[0390] 图25C展示在各种Ab处理之后,肿瘤相关CD45⁺ T细胞(其为CD8⁺ T细胞)的百分比。发现单药剂及组合组的CD8⁺ T细胞扩增量类似。然而,可由组合处理来改良CD8⁺ T细胞反应的质量。

[0391] 实施例28

抗CCR8及抗PD-1mAb在4T1鼠类乳腺癌模型中协同降低肿瘤生长

在4T1乳腺癌模型(另一种对抗mPD-1单药疗法具有抗性的小鼠肿瘤模型)中以单一药剂或与抗PD-1 Ab(克隆4H2)的组合形式测量抗CCR8-mIgG2a的抗肿瘤活性。亦用单独的4H2及对照性mIgG2a与mIgG1-D265A Ab的组合处理小鼠。向十五周龄雌性Balb/C小鼠(Envigo,Indianapolis,IN) SC注射 10^6 个4T1肿瘤细胞且在肿瘤植入后第7天,当肿瘤的中值尺寸达到约100mm³时随机分配至处理组中,每组10只小鼠。在植入后第7、10及14天,经由IP注射以200微克/小鼠施用Ab。每周两次记录肿瘤测量结果直至第27天,随后处死小鼠。使用GraphPad Prism进行数据分析及绘图。

[0392] 如图26中所示,单一药剂抗CCR8处理在小鼠4T1肿瘤模型中诱导部分抗肿瘤活性,而单独的抗PD-1处理在此模型中未呈现任何抗肿瘤功效。尽管抗PD-1未实现肿瘤生长抑制,但此Ab与抗CCR8 Ab的组合产生强协同相互作用,由在抗CCR8下观测到的抗肿瘤活性的显著增强证明,其中10只小鼠中的7只具有小于20mm³的肿瘤体积,相比之下,展示不受抑制的生长的肿瘤的平均体积为约1,500mm³。结合MB49数据(实施例27),此表明在抗PD-1抗性肿瘤模型中,抗CCR8处理在与抗PD-1处理组合时可诱导协同抗肿瘤作用。

[0393] 实施例29

抗CCR8 MAbs在SA1N纤维肉瘤小鼠模型中降低肿瘤生长

在SA1N纤维肉瘤小鼠模型中,测量抗CCR8-mIgG2a的抗肿瘤活性且与CCR8-mIgG1-D265A(一种具有Fc-惰性mIgG1-D265A重链的变异体)进行比较。向雌性A/J各自SC注射 10^6

个SA1N肿瘤细胞且在肿瘤植入后第5天随机分配至处理组中,每组9只小鼠。在植入后第5、8及12天,经由IP注射以200 μ l的体积,以200/小鼠施用Ab(抗CCR8-mIgG2a、抗CCR8-mIgG1-D265A或对照性mIgG2a Ab)。每周两次记录肿瘤测量结果直至植入后第57天,随后处死小鼠。使用GraphPad Prism进行数据分析及绘图。

[0394] 对于肿瘤浸润性淋巴细胞的分析,在植入后第16天收集小鼠肿瘤。以机械方式解离肿瘤且经由无菌100 μ M滤器过滤。用FcR阻断剂针对Fc受体来阻断样品,接着针对淋巴细胞群体进行表面染色,固定,透性化且针对Foxp3进行细胞内染色。接着,洗涤细胞且经由流式细胞仪处理。使用FlowJo软件进行分析且使用GraphPad Prism绘图。

[0395] 数据表明抗CCR8-mIgG2a有效降低肿瘤生长速率,其中9只小鼠中的9只在植入后第25天不具有肿瘤,而用对照性mIgG2a mAb进行的处理未抑制肿瘤生长(图27A)。经对照物处理的小鼠的测量在肿瘤植入后约57天之后停止,随后处死其余小鼠。这些数据表明抗CCR8 Ab在此SA1N小鼠模型中极有效地抑制肿瘤生长。有趣的是,用非消耗性抗CCR8 mAb(CCR8-mIgG1-D265A)处理小鼠引起肿瘤生长的部分抑制(图27A),表明至少在SA1N肿瘤模型中,由CCL1进行的CCR8接合可增强肿瘤环境中的Treg的免疫抑制。

[0396] 图27B展示在各种Ab处理之后,肿瘤相关CD4⁺ T细胞(其为Treg)的百分比。尽管在非消耗性抗CCR8-mIgG1-D265A处理下观测到抗肿瘤活性,但仅消耗性抗CCR8-mIgG2a处理引起肿瘤Treg消耗。阻断CCL1介导的Treg抑制的增强可引起增加的促炎性及抗肿瘤反应。

[0397] 实施例30

抗肿瘤功效需要抗CCR8的Fc接合型同型

为了进一步研究在抗肿瘤免疫中CCR8阻断与Ab介导的Treg细胞消耗的相关贡献,将抗mCCR8 Ab(来自BioLegend的克隆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)同功异型物,且用抗CCR8-mIgG2a或抗CCR8-mIgG1-D265A处理携带MC38肿瘤的小鼠。mIgG2a同型强效接合Fc受体以促进ADCC及ADCP,而mIgG1-D265A版本并非如此(Baudino等人,2008;Nimmerjahn等人,2010)。用抗CCR8-mIgG2a进行的处理诱导明显的肿瘤消退(图28A及D),而与用IgG2a同型对照物进行的处理(图28A及B)相比,抗CCR8-mIgG1-D265A处理在此MC38模型中对肿瘤生长不具有可辨别的作用(图28A及C)。重要的是,在用抗CCR8-mIgG2a处理后,肿瘤中的Treg的出现率降低75%,而抗CCR8-mIgG1-D265A处理未引起肿瘤Treg的出现率降低(图28E)。此与在体外实验的结果一致,该等实验表明尽管mAb 4A19介导肿瘤Treg的消耗,但具有惰性主链的抗CCR8Ab(抗CCR8-惰性)不消耗Treg,表明Treg消耗需要目标介导的经由nf主链进行的Fc γ R共同接合(实施例22)。其亦与在SA1N肿瘤模型中观测到的结果类似,在该肿瘤模型中,尽管用抗CCR8-mIgG1-D265A进行的处理引起肿瘤生长的部分抑制(实施例29),但未消耗免疫抑制性肿瘤Treg(图27B)。

[0398] 实际上,尽管具有类似结合特征,但抗CCR8-mIgG2a在存在表达CCR8的目标细胞的情况下有效交联Fc γ RIV,而CCR8-mIgG1-D265A同功异型物并非如此(资料未展示;参见Campbell等人,2021)。亦证实抗CCR8-mIgG2a及抗CCR8-mIgG1-D265A Ab皆以类似程度阻断CCL1结合(数据未展示;参见Campbell等人,2021)。

[0399] 可得出以下结论:抗肿瘤活性通常不需要CCR8阻断,但在某些免疫原性较高的肿瘤(诸如SA1N)中,归因于促炎性细胞因子的增加,阻断CCL1结合可引起肿瘤生长的部分抑

制。由免疫抑制性肿瘤Treg的消耗(其需要Fc接合型抗CCR8 Ab)引起更大的肿瘤消退。

[0400] 肿瘤中的FOXP3⁺ Treg迁移系与CCR8无关的作为正交方法,用同源Ccr8^{+/+}及Ccr8^{-/-}供体骨髓产生混合骨髓嵌合体以测定CCR8是否促进Treg的趋化性迁移从而产生肿瘤。

[0401] 骨髓嵌合体

以3小时间隔向雌性受体小鼠(WT-CD45.2-Thy1.1;Jackson Laboratory)提供2个剂量的4.5Gy,接着静脉内递送同源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,监测8周且在移植后第8周抽血以评估供体细胞重组。接着,SC植入10⁶个MC38细胞。在12天后收集肿瘤、全血、淋巴结及脾细胞以进行免疫监测。

[0402] 在8周重组阶段之后,在血液中观测到等效供体免疫细胞重组(资料未展示)。接着,向受体小鼠皮下植入MC38肿瘤。CCR8缺失型FOXP3⁺细胞与其野生型对应物类似地积聚于肿瘤中(图28F),证实肿瘤中的FOXP3⁺ Treg迁移系与CCR8无关的。

[0403] 实施例31

抗CCR8介导的Treg消耗增强肿瘤特异性CD8⁺ T细胞的记忆潜力

测量Treg消耗对识别肿瘤抗原AH1的长寿记忆CD8⁺ T细胞的产生的作用(Huang等人,1996)。

[0404] 向BALB/c小鼠皮下注射10⁶个CT26肿瘤细胞且在肿瘤体积达到100-120mm³时随机分配。在分级之后第1、4及8天,用每剂量200μg的抗CCR8-mIgG2a及抗mCTLA-4-IgG2a处理Ab或IgG2a同型对照物经眼眶来处理小鼠。在第9天收集肿瘤且在第11天以手术方式切除。在3个月之后,对小鼠进行抽血以定量AH-1特异性CD8⁺ T细胞。由10⁷CFU表达AH-1肽的重组单核球增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) (LM-AH1A5) 静脉内攻击小鼠。李斯特菌在经改良的无菌脑心浸出液培养液(Teknova Inc., Hollister, CA) 中培养隔夜以实现10⁹CFU/ml的固定相培养且接着用汉克氏平衡盐溶液(Hank's Balanced Salt solution; HBSS) 稀释至10⁸CFU/ml以用于免疫接种。在攻击后五天,收集脾及血液且经处理以用于流式细胞术。

[0405] 如所预期,与对照物(图29C)相比,抗mCTLA4-IgG2a及抗CCR8-mIgG2a诱导强效抗肿瘤反应(图29A及B)及Treg消耗(图29D)。在最后一次处理之后一天,用抗mCTLA-4-IgG2a或抗CCR8-mIgG2a处理的小鼠中的来自经切除的肿瘤的AH-1四聚物⁺细胞的出现率倾向于高于用对照物处理的小鼠(图29E),且在切除之后3个月,血液及脾中的AH-1四聚物⁺细胞仍较高(图29F)。在用表达AH-1的单核球增多性李斯特菌株攻击以评估AH-1特异性记忆回忆反应,最初用抗mCTLA-4-IgG2a或抗CCR8-mIgG2a处理的小鼠与对照小鼠相比具有更大的AH-1四聚物⁺效应子记忆细胞的回忆扩增(图29G)。

[0406] 在AH1A5肽刺激之后,经抗CCR8处理的小鼠在脾中亦具有明显更大的IFN γ⁺及多功能IFN γ⁺ TNFα⁺ CD8⁺ T细胞的量值(图29H及29I),表明用抗CCR8-mIgG2a处理携带肿瘤的小鼠引起具有加强的效应功能的肿瘤抗原特异性CD8⁺ T细胞的出现率提高。

[0407] 实施例32

肿瘤细胞上的CCR8的差异性表达

使用CCR8及CD8A的基因表达数据以区分将受益于用抗CCR8 Ab进行的治疗的肿瘤

类型的优先级。由在<https://www.cancer.gov/tcga>访问的TCGA Research Network产生的数据分析来自以下的RNA-seq基因表达资料：膀胱尿道上皮癌 (BLCA)、乳腺侵袭性癌 (BRCA)、子宫颈鳞状细胞癌及子宫颈内腺癌 (CESC)、结肠腺癌 (COAD)、食道癌 (ESCA)、多形性神经胶质母细胞瘤 (GBM)、头颈部鳞状细胞癌 (HNSC)、肾难染细胞 (KICH)、肾透明细胞癌 (KIRC)、肾乳头状细胞癌 (KIRP)、急性骨髓性白血病 (LAML)、脑部较低级别神经胶质瘤 (LGG)、肝细胞癌 (LIHC)、肺腺癌 (LUAD)、肺鳞状细胞癌 (LUSC)、间皮瘤 (MESO)、卵巢浆液性囊腺癌 (OV)、胰腺腺癌 (PAAD)、嗜铬细胞瘤及副神经节瘤 (PCPG)、前列腺腺癌 (PRAD)、直肠腺癌 (READ)、肉瘤 (SARC)、皮肤黑色素瘤 (SKCM)、胃腺癌 (STAD)、THCA、UCEC及UVM。使用用于产生有效的治疗学上适用的研究 (TARGET, <https://ocg.cancer.gov/programs/target>) 新方案来研究血液学肿瘤, 该方案的资料可在<https://portal.gdc.cancer.gov/projects>及M2GEN肿瘤学研究信息交换网络 (M2GEN Oncology Research Information Exchange Network; ORIEN) <https://www.oriencancer.org/datasets>获得。

[0408] 比较各肿瘤类型的来自CCR8及CD8A的TMM标准化的经log2转换的CPM值以及CCR8/CD8A的比率。在所研究的肿瘤类型中, 发现HNSC、LUAD、STAD、LUSC、PAAD、READ、ESCA、BRCA、COAD、CESC、滤泡性淋巴瘤急性淋巴细胞性白血病及淋巴瘤具有最高的相对CCR8表达。在各肿瘤类型中, KIRC、LUAD、LUSC、SKCM、STAD、CESC、MESO、HNSC、PAAD及BRCA表达最高的相对CD8A表达。使用CD8A/CCR8的比率来富集亦具有CCR8表达的CD8A阳性肿瘤。在所分析的肿瘤类型中, HNSC、STAD、LUAD、BRCA、LUSC、PAAD、LAML、CESC、SKCM及MESO表达最高的相对CD8A/CCR8表达。

[0409] 相对高CCR8及CD8A表达及其高CCR8/CD8A比率将HNSC、LUAD、STAD、LUSC、PAAD、READ、ESCA、BRCA、COAD、CESC、滤泡性淋巴瘤、急性淋巴细胞性白血病及淋巴瘤鉴定为预期尤其适于用抗CCR8 Ab治疗的肿瘤类型。

[0410] 实施例33

多种人类癌症中的CCR8表达

为了知晓多种癌症类型的CCR8表达概况以支持适应症选择, 在具有较高CCR8表达量的肿瘤类型最有可能对CCR8 mAb疗法起反应的潜在假设下, 在来自两个样品集合 (TR-TP及MTB集合) 的17种癌症类型或亚型中进行免疫组织化学 (IHC)。

[0411] TR-TP样品集合包含6种肿瘤类型/亚型的全尺寸福尔马林固定、石蜡包埋 (FFPE) 载玻片, 包括结肠直肠腺癌 (CRC)、头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC)、非小细胞肺腺癌 (NSCLC-AD)、非小细胞肺鳞状细胞癌 (NSCLC-SQC)、胰腺癌及小细胞肺癌 (SCLC), 其中每种肿瘤类型研究14-24个样品。FFPE组织样品系自各种市售组织供货商获得。

[0412] 此外, 研究含有16种肿瘤类型/亚型的多肿瘤块体 (MTB), 包括膀胱癌、乳腺癌、子宫颈癌、CRC、子宫内膜癌、胃癌、GBM、HNSCC、黑色素瘤、NHL、NSCLC-AD、NSCLC-SQC、卵巢癌、RCC、前列腺癌及胰腺癌, 其中每种肿瘤类型具有20个病例。以每个FFPE块体计, 各MTB含有单一适应症的5个病例及作为阳性对照的1个增生性扁桃体。MTB系由Discovery Life Sciences定制。

[0413] 为了侦测CCR8组织结合, 研发自动IHC测定法且用市售小鼠抗hCCR8 mAb, 克隆433H (BD Biosciences) 及Leica Bond RX System (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) 验证。将载玻片脱蜡且根据例行组织学程序复水。将湿润的载玻片装载至Leica Bond RX自

动IHC染色机上以进行热诱导的表位回收 (Heat Induced Epitope Retrieval; HER) 及染色。在100℃下用Leica Bond回收溶液ER2 (pH 9) 进行HER历时30分钟, 且用Bond聚合物优化侦测系统 (Leica) 进行CCR8 IHC染色。简言之, 进行过氧化酶阻断 (Leica) 历时10分钟, 接着使用补充有0.5% 人类 γ 球蛋白 (Sigma) 的Dako无血清蛋白质阻断剂 (Agilent, Santa Clara, CA) 进行非特异性结合阻断历时20分钟。将433H原发性Ab以0.25 μ g/ml培育60分钟, 接着将兔抗小鼠连接符且接着抗兔Poly-HRP-IgG (Leica) 各自培育8分钟。最终, 使载玻片与DAB受质-色素原溶液 (Leica) 反应10分钟。接着, 用苏木精 (Leica) 将载玻片对比染色5分钟且脱水, 清洗且根据例行组织学程序盖上盖玻片。使用Leica AT Turbo扫描仪扫描经染色的载玻片且使用HALO®软件 (Indica Labs, Albuquerque, NM) 进行完整载玻片影像分析。CCR8表达报道为肿瘤区域内的所有细胞中的阳性细胞的百分比。在样品的小型子集中, 当委员会认证的病理学家认为影像分析分数未产生准确结果时, 由病理学家进行人工目视评分。

[0414] 强CCR8阳性染色主要分布于展示膜性及细胞质模式的免疫细胞的子集中。亦在少数病例中观测到肿瘤细胞中的弱至中等细胞质染色。TR-TP全尺寸组织切片中的CCR8⁺细胞的完整载玻片影像分析展示于图30A中, 而MTB集合中的CCR8⁺细胞的完整载玻片影像分析展示于图30B中。TR-TP及MTB数据集皆指示在所评估的17种肿瘤类型中, CCR8表达在HNSCC中最高且在GBM中最低。按照最高至最低CCR8表达的顺序, 肿瘤群组排序如下: HNSCC、子宫颈癌、CRC、NSCLC-SCC、NSCLC-ADC、胰腺癌、胃癌、膀胱癌、乳腺恶性肿瘤、卵巢癌及GBM。RCC、前列腺、黑素瘤、子宫内膜及NHL肿瘤群组展示类似的CCR8表达量且低于在乳腺癌肿瘤群组中观测到的表达。

[0415] 基于具有高CCR8表达的肿瘤更可能对CCR8 mAb疗法起反应的假设, 这些肿瘤分析数据支持适应症选择的以下优先排序: HNSCC、子宫颈癌、CRC、NSCLC-SCC、NSCLC-ADC、胰腺癌、胃癌、膀胱癌及乳腺癌。

[0416] 实施例34

用抗CCR8治疗癌症的1/2期临床研究

在具有所选择的晚期实体肿瘤 (亦即, NSCLC、SCCHN、CRC、胃/胃食道 (GE) 接合区癌及子宫颈癌) 的患者个体中进行以单药疗法及与抗PD-1 mAb (纳武单抗) 的组合形式施用的4A19抗CCR8 mAb的1/2期研究, 以尤其评估以单一药剂及与纳武单抗的组合疗法形式施用4A19的安全性、耐受性且初步评估功效。

[0417] 研究设计

此研究由4个部分构成: 以剂量递增 (部分1A) 及剂量扩增 (部分2A) 方式, 以单药疗法形式施用的4A19, 以及以剂量递增 (部分1B) 及扩增 (部分2B) 方式, 与纳武单抗组合施用的4A19。

[0418] 在剂量递增阶段, 为了鉴定抗CCR8的适合的剂量, 除了由每剂量水平至少1名个体组成的4A19单药疗法的最低的2个剂量水平 (以最小化接收潜在次有效剂量的4A19的参与者的数目) 以外, 针对各剂量向至少3名个体施用某一范围内的剂量的4A19。在部分1A中, 以0.3、1、3、10、30、100、300及800mg, 每2周一次 (Q2W) 的平剂量向个体静脉内 (IV) 施用4A19。使用由基于药理学及毒理学的方法的混合方法产生的全部数据获得4A19的首次用于人体 (FIH) 的起始平剂量, 即0.3mg (4 μ g/kg), IV, Q2W, 以确保足够的安全性同时最小化参与者对

潜在次有效剂量的暴露及细胞因子释放的风险。

[0419] 在部分1B中,向个体静脉内施用相同平剂量的4A19且IV施用FDA认可的平剂量(480mg,每4周一次(Q4W))的纳武单抗。

[0420] 对于剂量扩增,开放包括来自递增阶段的不同肿瘤类型及剂量水平的单一组及随机化组以向每个组至少20名个体施用单药疗法及组合疗法。

[0421] 所有个体完成至多3个研究周期:

(a) 筛选(直至第28天),在此期间,评估个体以证实其满足合格性准则且提供新鲜肿瘤活检;

(b) 治疗(自第一治疗开始的至多26个研究疗法循环[104周],不考虑治疗延迟,每个循环28天);及

(c) 随访,包括安全性及存活率随访(治疗结束[EOT]后历时至多2年)。研究参与的最大持续时间为约4年(历时至多28天的筛选,历时至多2年的治疗及历时至多2年的随访)。

[0422] 向个体施用Ab药物直至出现进展、不可接受的毒性、撤回同意书、完成26个研究疗法循环(104周)或研究结束(以首先发生的为准)。

[0423] 表10.SEQ ID NO.及氨基酸序列概述

SEQ ID NO.	序列说明	氨基酸序列
1	人CCR8的氨基酸序列	MDYTLDLSTV TVTDYYYPDI FSSPCDAELI QTNGKLLAV FYCLLFVFS LGNSLVILVL VVCKKLRSIT DVYLLNLALS DLLFVFSFPF QTYLLDQWV FGTVMCKVVS GFYIGFYSS MFFITLMSVD RYLAVVHAVY ALKVRTIRMG TTLCLAVWLT AIMATIPLL FYQVASEDGV LQCYSFYNNQ TLKWKIFTNF KMNILGLLIP FTIFMFCYIK ILHQLKRCQN HNKTKAIRLV LIVVIASLLF WVPFNVVLFL TSLHSMHILD GCSISQQLTY ATHVTEIISF THCCVNPVIY AFVGEKFKKH LSEIFQKSCS QIFNYLGRQM PRESCEKSSS CQQHSSRSSS VDYIL
2	人CCR8序列的氨基酸残基15-21	YYYPDIF
3	mAb 16B13中的V _H 的氨基酸序列	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFNMNWRQA PGKGLEWISY ISSGSTTIAH ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCVRL KGSFDYWGQG TLTVSS
4	mAb 14S15中的V _H 的氨基酸序列	EVQLVEFGGG LVQPKGSLKL SCVVSFGRFN PYAMNWRQA PGKGLEWLGR IRKSNNYET YYADSVKDRF IISRDDSQKM VYLQMNNVKT EDTAMYYCVG YSDLYVLIDYV GQGTSTVTVSS
5	mAb 18Y12中的V _H 的氨基酸序列	QVQLQSGGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT DYEMHWVKQT PVHGLEWIGA IDPKTGSTAY NQKFKGKAIM TADKSSSTAY MELRSLTSED SVVYYCTGLR RFVYWGQGT VTVSA
6	mAb 4A19中的V _H 的氨基酸序列	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DSEMHWRQA TGQGLEWMGA IQPETGGTAY NQKFKARVTM TRDTSISTAY MELSLRSED TAVYYCARRR RNFDYWGQGT LTVTVSS
7	mAb 2M18中的V _H 的氨基酸序列	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCVVSFGRFN NFMNIWVRQV PGKGLEWISH ISRGGTTINH ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARRR LGVFDYWGQG TLTVSS
8	mAb 15C17中的V _H 的氨基酸序列	QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYDMNWRQA PGKGLEWISY ISSNGNKKH ADSVKGRFTI SRDNAENSLY LQMNSLRDED TAVYYCARRR QGVFDIWGQG TLTVSS
9	mAb 13T20中的V _H 的氨基酸序列	QVQLVESGGG LVKPRGSLRL SCAASGFTFS VAMHWVRQA PGKGLEWVGR IKSKTDGGTT DYATPVKGRF TISRDDSKNT LYLQMHSLKT EDTAVYYCTV VTMVRGVLYD FWGQGTTLTV SS
10	mAb 10R3中的V _H 的氨基酸序列	QVQLVESGGG VVQPGSLRL SCAASGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVGI ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TALYSCARVP NWRGAFDIWG QGTMTVTVSS
11	mAb 8D55中的V _H 的氨基酸序列	QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYNMIWVRQT PGKGLEWISY ISSRSIISY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARRW KGVFDYWGQG TLTVSS
12	mAb 1V11中的V _H 的氨基酸序列	QVQLVESGGG VVQPGSLRL SCAASGFTFS NYAMHWVRQA PGKGLDWLAV ISYDGSNKYH SDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQINSLRAED AAVYYCARRG ELGIGGFDYV GQGTTLTVTVSS

SEQ ID NO.	序列说明	氨基酸序列
13	mAb 11K16中的V _H 的氨基酸序列	QVQLVESGGG LVLPGGSLRL SCAASGFTFS SNNMIWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTISY ADSVRGRFTI SRDNAKNSLF LQMNSLRDED TAVYYCARRW RGVFDYWGQG TLVTVSS
14	mAb 12F27中的V _H 的氨基酸序列	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFSFR SYGIHWVRQA PGKGLEWVAV ISYEGSNKRY ADSVKGRFTI SRDNSKSTLS LQMNSLRAED TAVYYCAKGR RPSGEGAFDI WQGTMTVTVS
15	mAb 16B13中的V _L 的氨基酸序列	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYG ASRLQSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGQ GTKVEIK
16	mAb 14S15中的V _L 的氨基酸序列	DIVMTQAAPS VPVTPGESVS ISCRSSKSLL HSNGNTFLYW FLQRPQGSPQ LLIYRMSNLA SGVPHRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP FTFGSGTKLE IK
17	mAb 18Y12中的V _L 的氨基酸序列	DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSRQSLV HSSGYTYLHW YLQKPGQSPK LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP FTFGSGTKLE IK
18	mAb 4A19中的V _L 的氨基酸序列	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSFL HSSGNTYLHW YLQKPGQPPQ LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHVP FTFGQGTKLE IK
19	mAb 2M18中的V _L 的氨基酸序列	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGQ GTKVEIK
20	mAb 15C17中的V _L 的氨基酸序列	DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS RWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK
21	mAb 13T20中的V _L 的氨基酸序列	DIVMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSTTFGG GTKVEIK
22	mAb 10R3中的V _L 的氨基酸序列	EIVLTQSPDF QSVTPKEKVT ITCRASQSIG SHLHWYQQKP DQSPKLLIKY ASQSFGVPS RFGSGSGSTD FSLTINSLET EDAATYFCHQ SYSPLPLTFGG GTKVEIK
23	mAb 8D55中的V _L 的氨基酸序列	DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGQ GTKVEIK
24	mAb 1V11中的V _L 的氨基酸序列	DIVMTQTPLS SPVTLGRPAS ISCRSSRSLV HTDGNTYLNW LQQRPGQPPR LLIYKISNRF SGVPDRFSGS GAGTDFTLKI TRVEAEDVGV YYCMQATQFP LTFPGGTKVD IK
25	mAb 11K16中的V _L 的氨基酸序列	DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGQ GTKVEIK

SEQ ID NO.	序列说明	氨基酸序列
26	mAb 12F27中的V _L 的氨基酸序列	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSFPPTFGQ GTKVEIK
27	mAb 16B13中的V _H CDR1的氨基酸序列	GFTFSSFNMN
28	mAb 16B13中的V _H CDR2的氨基酸序列	YISSGSTTIA HADSVKG
29	mAb 16B13中的V _H CDR3的氨基酸序列	RLKGSFDY
30	mAb 16B13中的V _L CDR1的氨基酸序列	RASQGISSWL A
31	mAb 16B13中的V _L CDR2的氨基酸序列	GASRLQS
32	mAb 16B13中的V _L CDR3的氨基酸序列	QQYNSYPPT
33	mAb 14S15中的V _H CDR1的氨基酸序列	GFRFNPYAMN
34	mAb 14S15中的V _H CDR2的氨基酸序列	RIRSKSNNYE TYYADSVKD
35	mAb 14S15中的V _H CDR3的氨基酸序列	YSDLYVLDY
36	mAb 14S15中的V _L CDR1的氨基酸序列	RSSKSLLSN GNTFLY
37	mAb 14S15中的V _L CDR2的氨基酸序列	RMSNLAS
38	mAb 14S15中的V _L CDR3的氨基酸序列	MQHLEYPPT
39	mAb 18Y12中的V _H CDR1的氨基酸序列	GYTFTDYEMH
40	mAb 18Y12中的V _H CDR2的氨基酸序列	AIDPKTGSTA YNQKFKG
41	mAb 18Y12中的V _H CDR3的氨基酸序列	LRRFVY
42	mAb 18Y12中的V _L CDR1的氨基酸序列	RSSKSLLSN GNTFLY
43	mAb 18Y12中的V _L CDR2的氨基酸序列	RVSNRFS
44	mAb 18Y12中的V _L CDR3的氨基酸序列	SQSTHVPPT
45	mAb 4A19中的V _H CDR1的氨基酸序列	GYTFTDSEMH
46	mAb 4A19中的V _H CDR2的氨基酸序列	AIQPETGGTA YNQKFKA
47	mAb 4A19中的V _H CDR3的氨基酸序列	RRRNFDY
48	mAb 4A19中的V _L CDR1的氨基酸序列	RSSQSLFHSS GNTYLH
49	mAb 4A19中的V _L CDR2的氨基酸序列	KVSNRFS
50	mAb 4A19中的V _L CDR3的氨基酸序列	SQSTHVPPT
51	mAb 2M18中的V _H CDR1的氨基酸序列	GFTFSNFMNI
52	mAb 2M18中的V _H CDR2的氨基酸序列	HISRGGTTIN HADSVKG
53	mAb 2M18中的V _H CDR3的氨基酸序列	RLGVFDY

SEQ ID NO.	序列说明	氨基酸序列
54	mAb 2M18中的V _L CDR1的氨基酸序列	RASQGISSWL A
55	mAb 2M18中的V _L CDR2的氨基酸序列	AASSLQS
56	mAb 2M18中的V _L CDR3的氨基酸序列	QQYNSYPPT
57	mAb 15C17中的V _H CDR1的氨基酸序列	GFTFSSYDMN
58	mAb 15C17中的V _H CDR2的氨基酸序列	YISSSNGNKH HADSVKG
59	mAb 15C17中的V _H CDR3的氨基酸序列	RQGVFDI
60	mAb 15C17中的V _L CDR1的氨基酸序列	RASQGISRWL A
61	mAb 15C17中的V _L CDR2的氨基酸序列	AASSLQS
62	mAb 15C17中的V _L CDR3的氨基酸序列	QQYNSYPPT
63	mAb 13T20中的V _H CDR1的氨基酸序列	GFTFSVAVMH
64	mAb 13T20中的V _H CDR2的氨基酸序列	RIKSKTDGGT TDYATPVKG
65	mAb 13T20中的V _H CDR3的氨基酸序列	VTMVRGVLYD F
66	mAb 13T20中的V _L CDR1的氨基酸序列	RASQSVSSNY LA
67	mAb 13T20中的V _L CDR2的氨基酸序列	GASSRAT
68	mAb 13T20中的V _L CDR3的氨基酸序列	QQYGSSRT
69	mAb 10R3中的V _H CDR1的氨基酸序列	GFTFSSYAMH
70	mAb 10R3中的V _H CDR2的氨基酸序列	IISYDGSNKY YADSVKG
71	mAb 10R3中的V _H CDR3的氨基酸序列	VPNWRGAFDI
72	mAb 10R3中的V _L CDR1的氨基酸序列	RASQSIGSHL H
73	mAb 10R3中的V _L CDR2的氨基酸序列	YASQSFS
74	mAb 10R3中的V _L CDR3的氨基酸序列	HQSYSLPLT
75	mAb 8D55中的V _H CDR1的氨基酸序列	GFTFSNYNMI
76	mAb 8D55中的V _H CDR2的氨基酸序列	YISSRSIIS YADSVKG
77	mAb 8D55中的V _H CDR3的氨基酸序列	RWKGVPDY
78	mAb 8D55中的V _L CDR1的氨基酸序列	RASQGISSWL A
79	mAb 8D55中的V _L CDR2的氨基酸序列	AASSLQS
80	mAb 8D55中的V _L CDR3的氨基酸序列	QQYNSYPPT
81	mAb 1V11中的V _H CDR1的氨基酸序列	GFTFSNYAMH
82	mAb 1V11中的V _H CDR2的氨基酸序列	YDGSNKYHSD SVKG

SEQ ID NO.	序列说明	氨基酸序列
83	mAb 1V11中的V _H CDR3的氨基酸序列	RGELGIGGFD Y
84	mAb 1V11中的V _L CDR1的氨基酸序列	RSSRSLVHTD GNTYLN
85	mAb 1V11中的V _L CDR2的氨基酸序列	KISNRFS
86	mAb 1V11中的V _L CDR3的氨基酸序列	MQATQFPLT
87	mAb 11K16中的V _H CDR1的氨基酸序列	GFTFSSNNMI
88	mAb 11K16中的V _H CDR2的氨基酸序列	YISSSSSTIS YADSVRG
89	mAb 11K16中的V _H CDR3的氨基酸序列	RWRGVFDY
90	mAb 11K16中的V _L CDR1的氨基酸序列	RASQGISSWL A
91	mAb 11K16中的V _L CDR2的氨基酸序列	AASSLQS
92	mAb 11K16中的V _L CDR3的氨基酸序列	QQYNSYPPT
93	mAb 12F27中的V _H CDR1的氨基酸序列	GFSFRSYGIH
94	mAb 12F27中的V _H CDR2的氨基酸序列	VISYEGSNKR YADSVKG
95	mAb 12F27中的V _H CDR3的氨基酸序列	GRRPSGEGAF DI
96	mAb 12F27中的V _L CDR1的氨基酸序列	RASQGISSWL A
97	mAb 12F27中的V _L CDR2的氨基酸序列	AASSLQS
98	mAb 12F27中的V _L CDR3的氨基酸序列	QQYNSFPPT
99	16B13的重链mAb的氨基酸序列	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFNMNWRQA PGKGLEWISY ISSGSTTIAH ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCVRRRL KGSFDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK
100	14S15的重链mAb的氨基酸序列	EVQLVEFGGG LVQPKGSLKL SCVVSQFRFN PYAMNWRQA PGKGLEWLGR IRSKSNNYET

SEQ ID NO.	序列说明	氨基酸序列
		YYADSVKDRF IISRDDSQKM VYLQMNNVKT EDTAMYICVG YSDLYVLDYW GQGTSTVTSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGPPEPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
101	18Y12的重链mAb的氨基酸序列	QVQLQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT DYEMHWVKQT PVHGLEWIGA IDPKTGSTAY NQKFKGKAIM TADKSSSTAY MELRSLTSED SVVYYCTGLR RFVYWGQGT VTSAASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSST LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KRVEPKSCDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK
102	4A19的重链mAb的氨基酸序列	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DSEMHWVRQA TGQGLEWMGA IQPETGGTAY NQKFKARVTM TRDTSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARRR RNFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSST SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHCTPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPG
103	mAb 14S15h中的V _H CDR1的氨基酸序列	GFRFGPYAMN
104	mAb 14S15h中的V _H CDR2的氨基酸序列	RIRSKSNYE TYADSVKD
105	mAb 14S15h中的V _H CDR3的氨基酸序列	YSDLYVLDY
106	mAb 14S15h中的V _L CDR1的氨基酸序列	RSSKSLLSQ GNTFLY

SEQ ID NO.	序列说明	氨基酸序列
	列	
107	mAb 14S15h中的V _L CDR2的氨基酸序列	RMSNLAS
108	mAb 14S15h中的V _L CDR3的氨基酸序列	MQHLEYPT
109	人CCR8序列的氨基酸残基12-22	VTDYYPDIFS
110	mAb 12F27的重链的氨基酸序列	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFSTR SYGIIHWVRQA PGKGLEWVAV ISYEGSNKRY ADSVKGRFTI SRDNSKSTLS LQMNSLRAED TAVYYCAKGR RPSGEGAFDI WGQGMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
111	mAb 16B13的轻链的氨基酸序列	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAHYQQKP EKAPKSLIYG ASRLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
112	mAb 14S15的轻链的氨基酸序列	DIVMTQAAPS VPVTPGESVS ISCRSSKSL HSNNGNTFLYW FLQRPQSPQ LLIYRMSNLA SGVPHRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP FTFGSGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
113	mAb 18Y12的轻链的氨基酸序列	DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSRQSLV HSSGYTYLHW YLQKPGQSPK LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP FTFGSGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

SEQ ID NO.	序列说明	氨基酸序列
114	mAb 4A19的轻链的氨基酸序列	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSLEF HSSGNTYLHW YLQKPGQPPQ LLIYKVSNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHVP FTFGQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
115	mAb 14S15h中的V _H 的氨基酸序列	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFRFG PYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKSNNYET YYADSVKDRF TISRDDSKNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCVG YSDLYVLDYW GQGTLLTVSS
116	mAb 14S15h中的V _L 的氨基酸序列	DIVMTQTFFS LPVNPGEFAS ISCRSSKSLL HSQGNFTLYW YLQKPGQSPQ LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGSDFTLKI SWVEAEDVGV YYCMQHLEYP FTFGPGTKVD IK
117	mAb 14S15h的重链的氨基酸序列	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFRFG PYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKSNNYET YYADSVKDRF TISRDDSKNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCVG YSDLYVLDYW GQGTLLTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVFP KSCDKHTTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
118	mAb 14S15h的轻链的氨基酸序列	DIVMTQTFFS LPVNPGEFAS ISCRSSKSLL HSQGNFTLYW YLQKPGQSPQ LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGSDFTLKI SWVEAEDVGV YYCMQHLEYP FTFGPGTKVD IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
119	12F27的轻链mAb的氨基酸序列	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKPK EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGSDT FTLTISLQPEDFATYYCQQ YNSFPPFTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSTLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
SEQ ID NO.	序列说明	氨基酸序列
120	小鼠CCR8的氨基酸序列	MDYTMENPVT MTDYYPDFFT APCDAEFLLR GSMYLAILEY CVLFVLGGLG NSLVILVLVG CKKLRSITDI YLLNLAASDL LFLVLSIPFQT HNLLDQWVFG TAMCKVVSGL YYIGFFSSMF FITLMSVDRY LAIVHAVYAI KVRTASVGTA LSLTVWLAAY TATIPLMVFY QVASEDGMQLQ CFQFYEEQSL RWKLFTHFEI NALGLLLPFA ILLFCYVRIL QQLRGCLNHN RTRAIKLVLT VVIIVSLFVW PFNVALFLTS LHDHLILDGC ATRQRLALAI HVTEVISFTH CCVNPVIYAF IGEKFKKHLMDVFQKSCSHI FLYLGRQMPV GALERQLSSN QRSSHSSTLD DIL

[0424] 参考文献

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-L1as 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)IRF4instructs 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-CD25depletes tumor-infiltrating regulatory T cells and synergizes with PD-1blockade 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. J Cancer 8(3):410-416.

Hagemann UB, Gunnarsson L, Geraudie S, Scheffler U, Griep RA et al. (2014) Fully human antagonistic antibodies against CCR4 potentially 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, Hessel 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 93(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.

Khattari 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(13Suppl):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 Ghouli 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. *J Immunother 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, Heimbarg-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 Fc γ RIIA and Fc γ RIIA 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) Fc γ RIV 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,Ngiew 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. *J Mol 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. *Biotechnol Bioeng* 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.

<110> 百时美施贵宝公司
 <120> 抗CCR8抗体用于治疗癌症
 <130> 13358-W0-PCT
 <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

$\langle 210 \rangle$	4
$\langle 211 \rangle$	120
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	智人
$\langle 400 \rangle$	4

$\langle 210 \rangle$	5
$\langle 211 \rangle$	115
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	智人
$\langle 400 \rangle$	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 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
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
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
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
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
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro		80
	85	90
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		95
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
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn		15
	20	25
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		30
	35	40
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		45
50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
65	70	75
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Arg		80
	85	90
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		95
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
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser His		15
	20	25
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		30
	35	40
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		45
50	55	60

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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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															

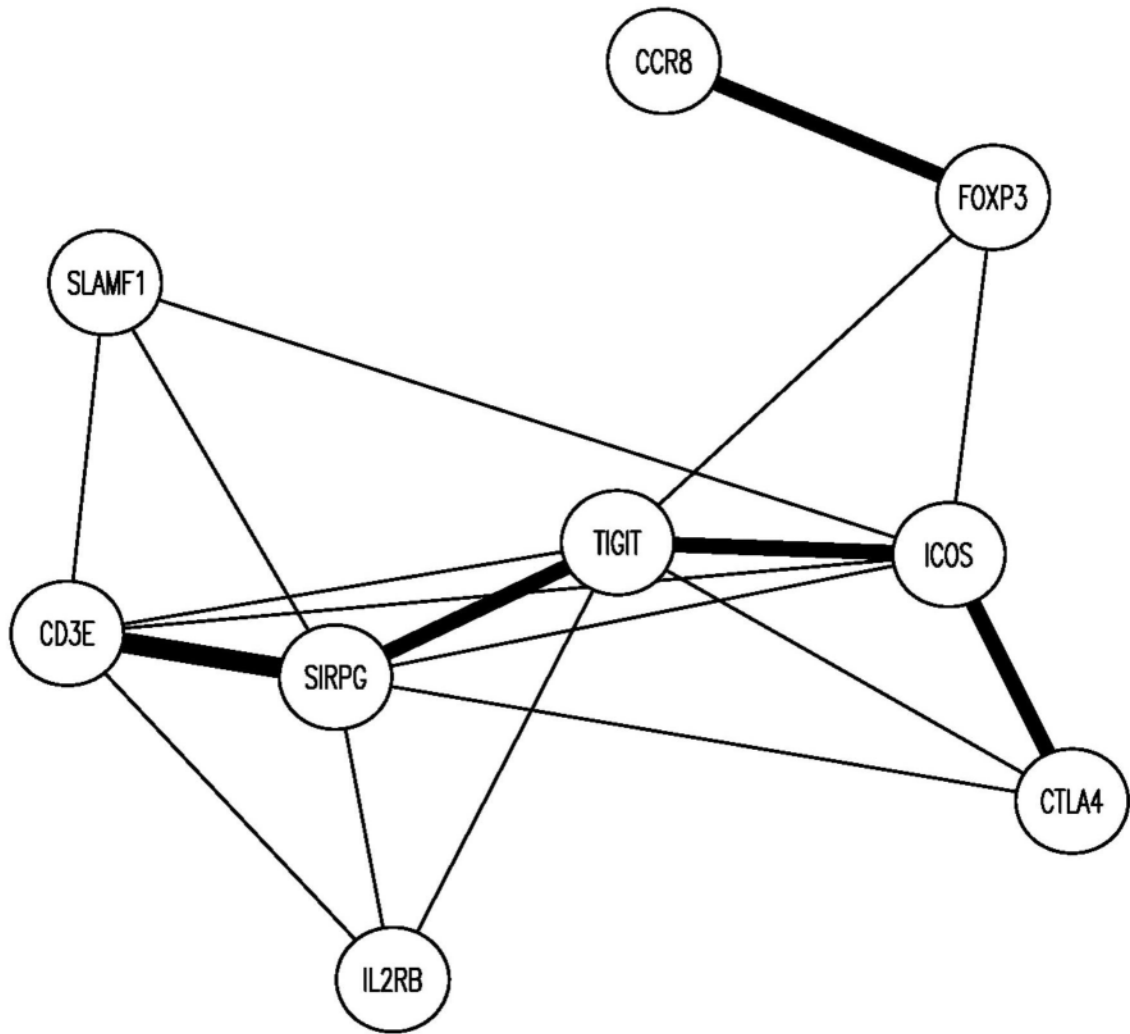


图1A

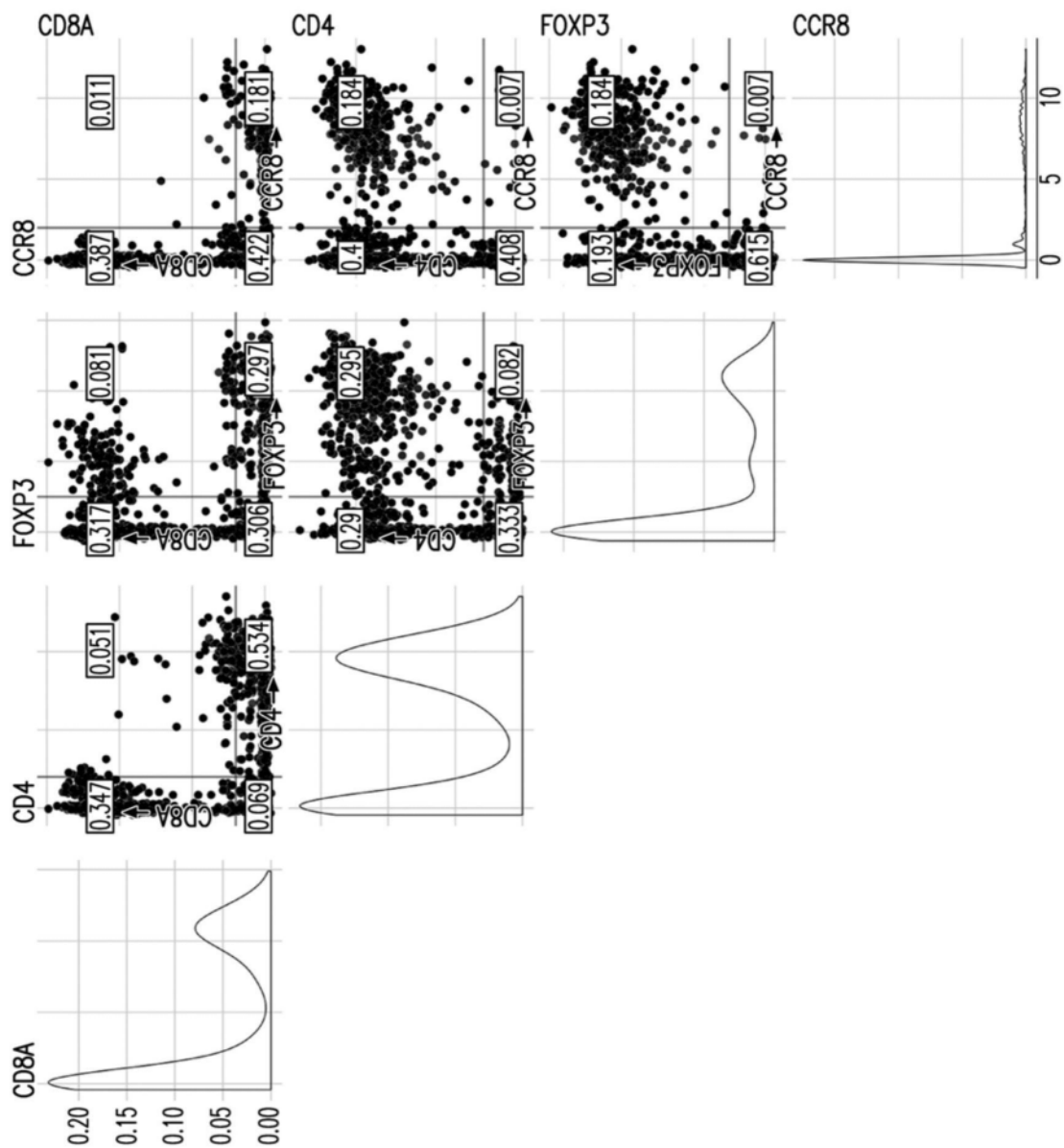


图1B

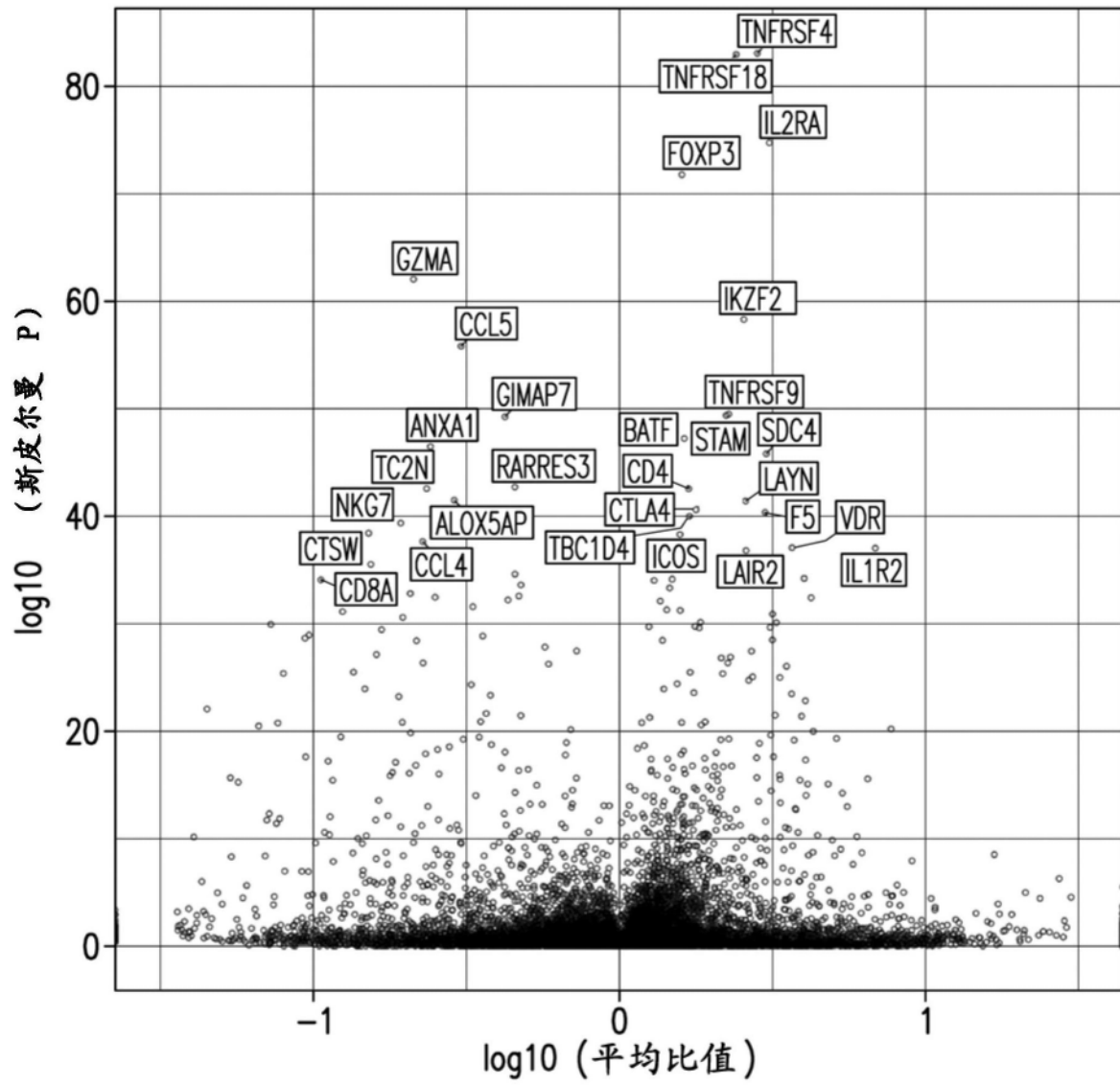


图1C

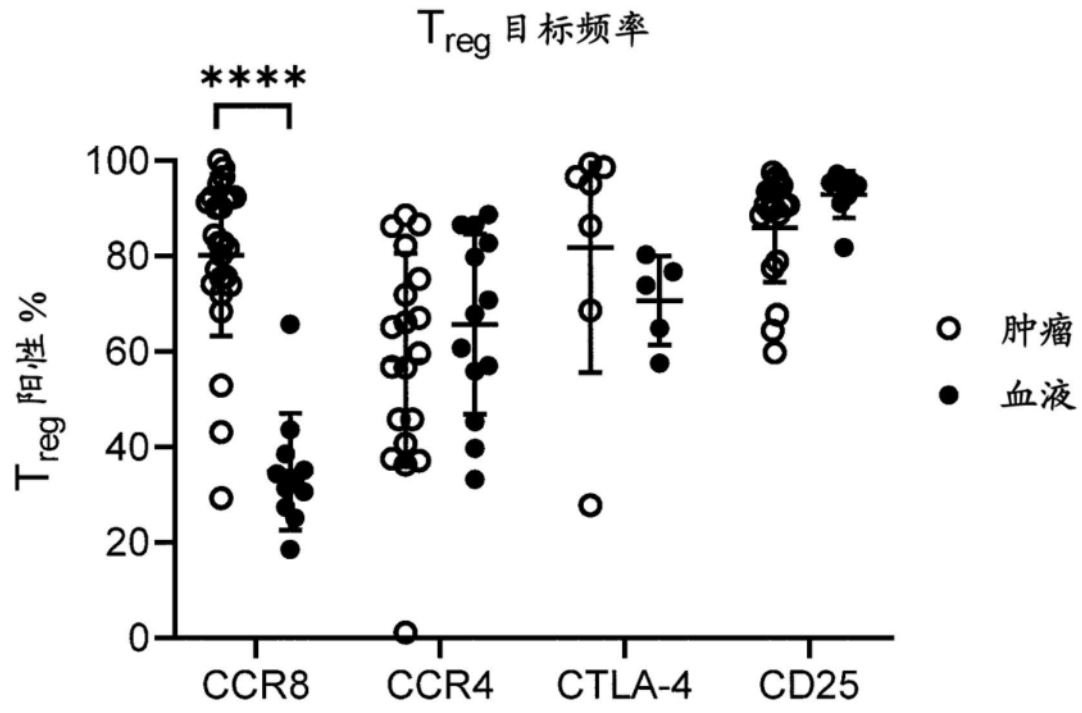


图2A

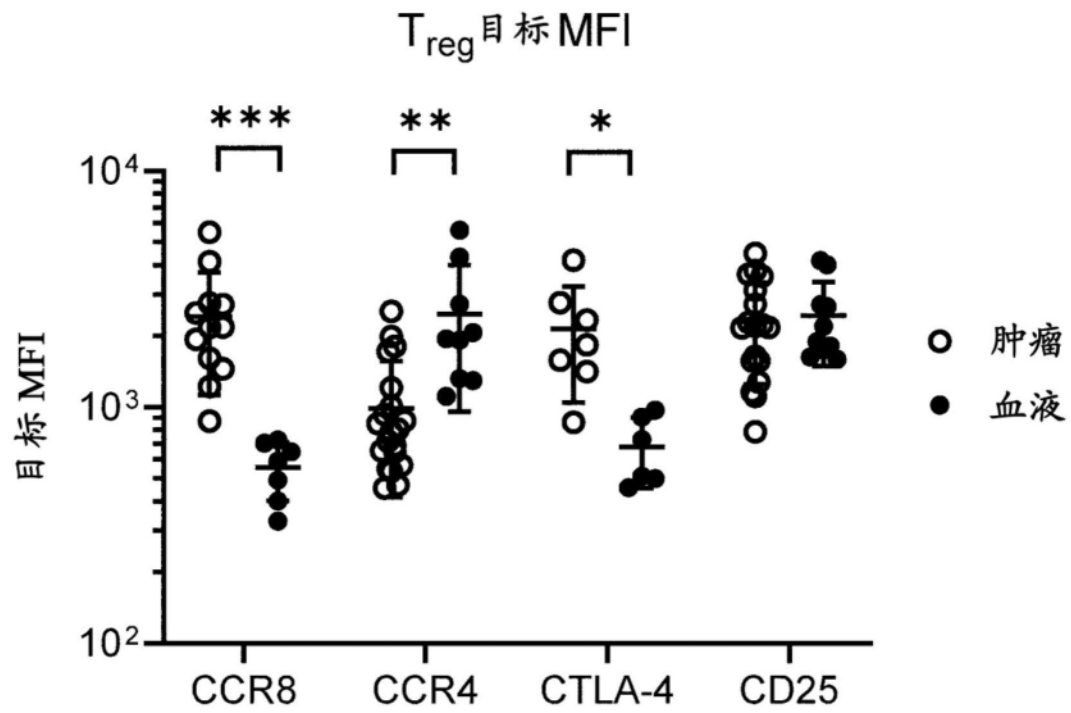


图2B

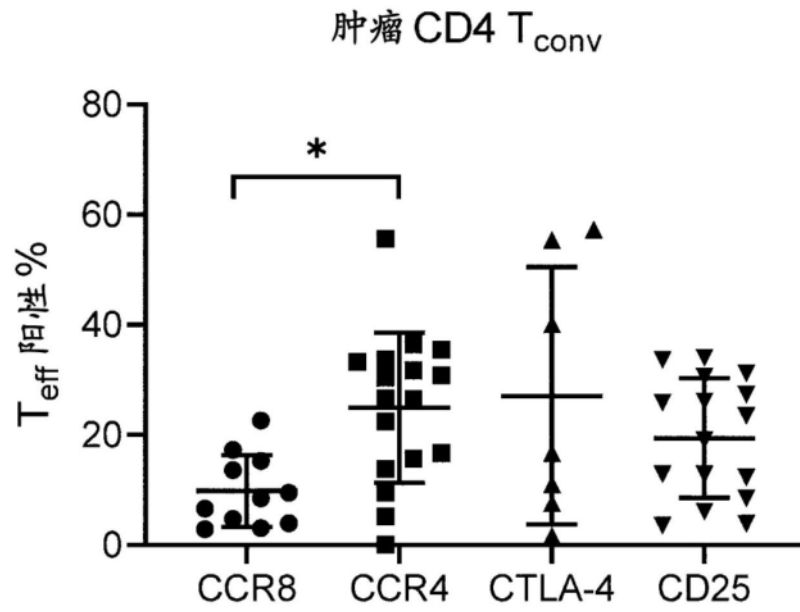


图2C

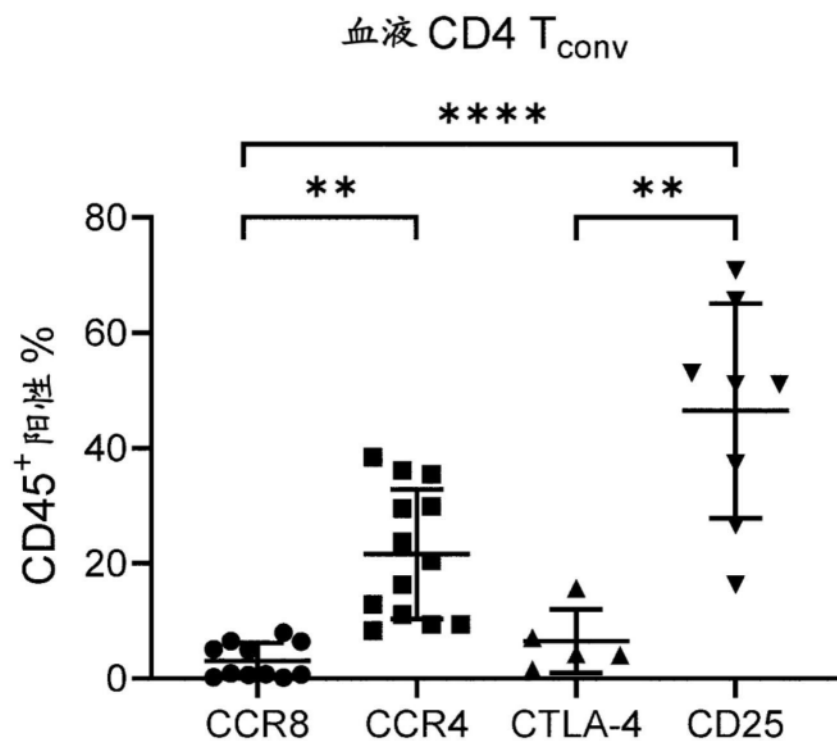


图2D

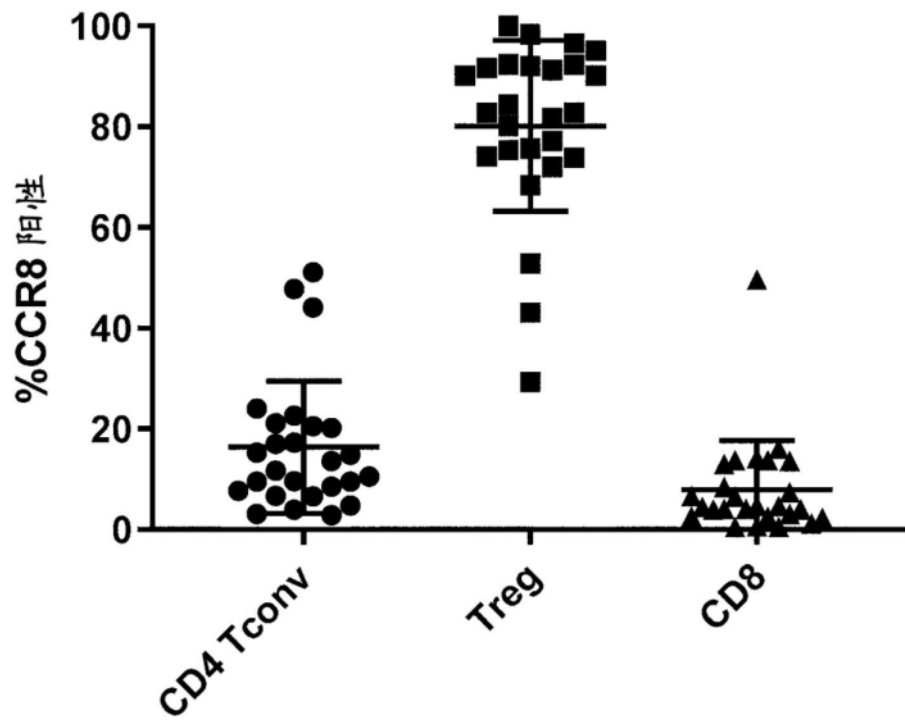


图3A

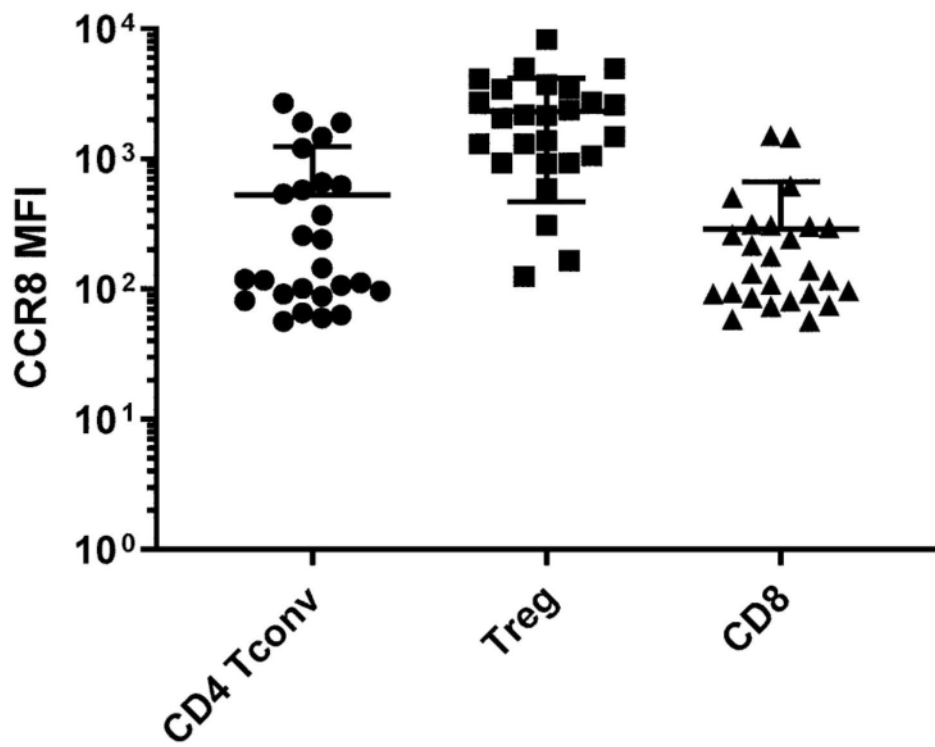


图3B

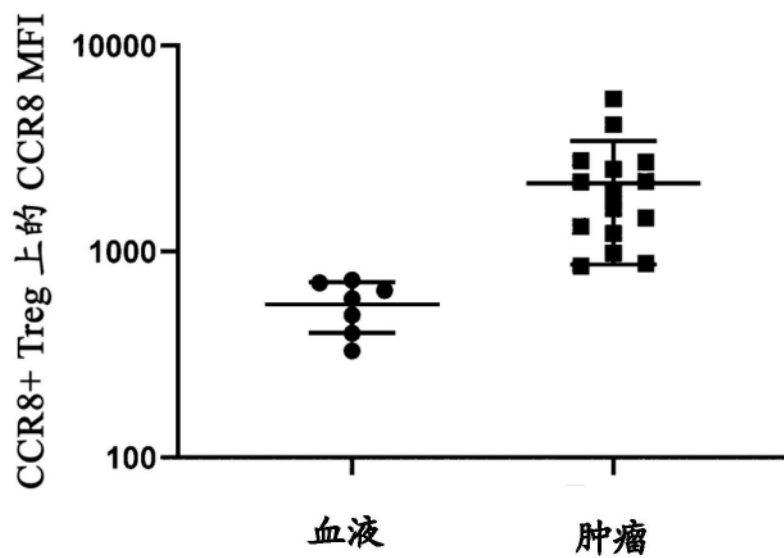


图3C

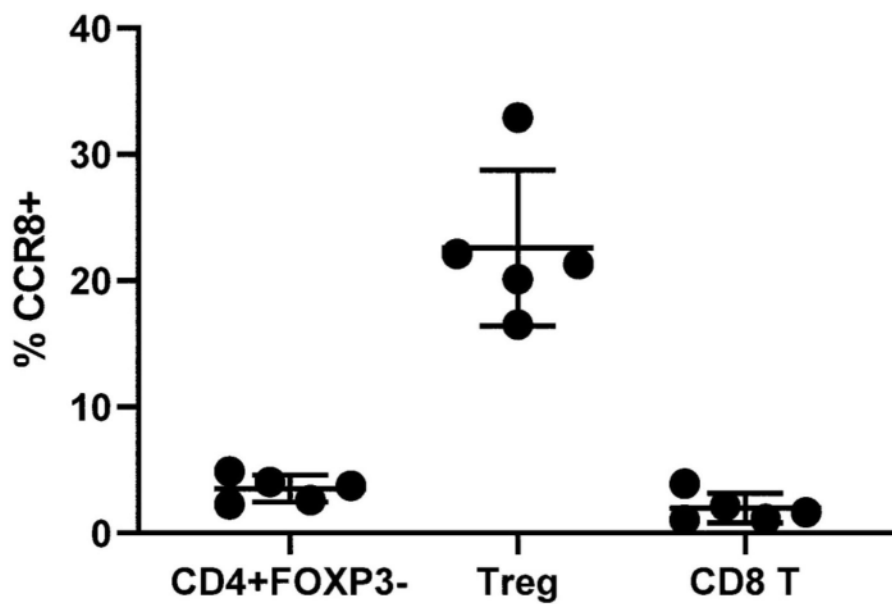


图4A

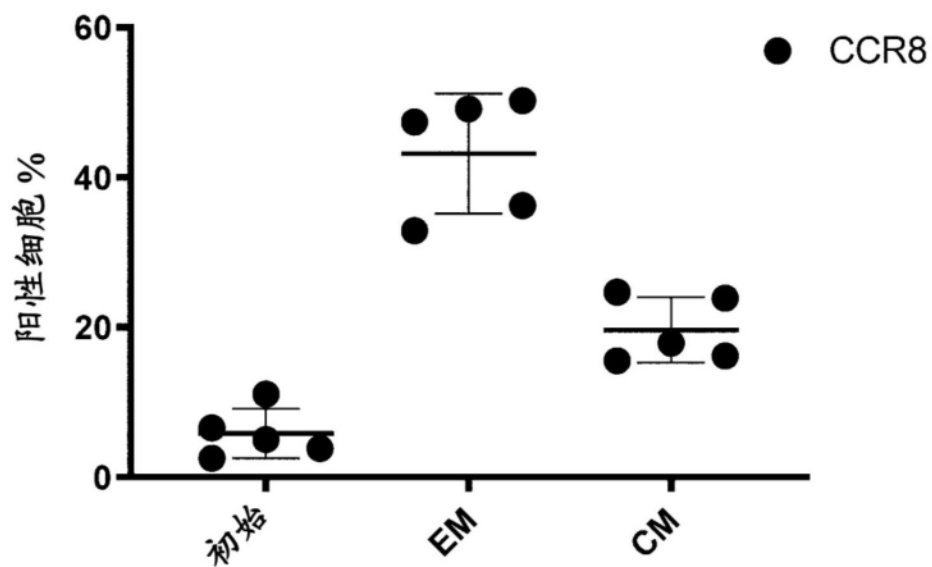


图4B

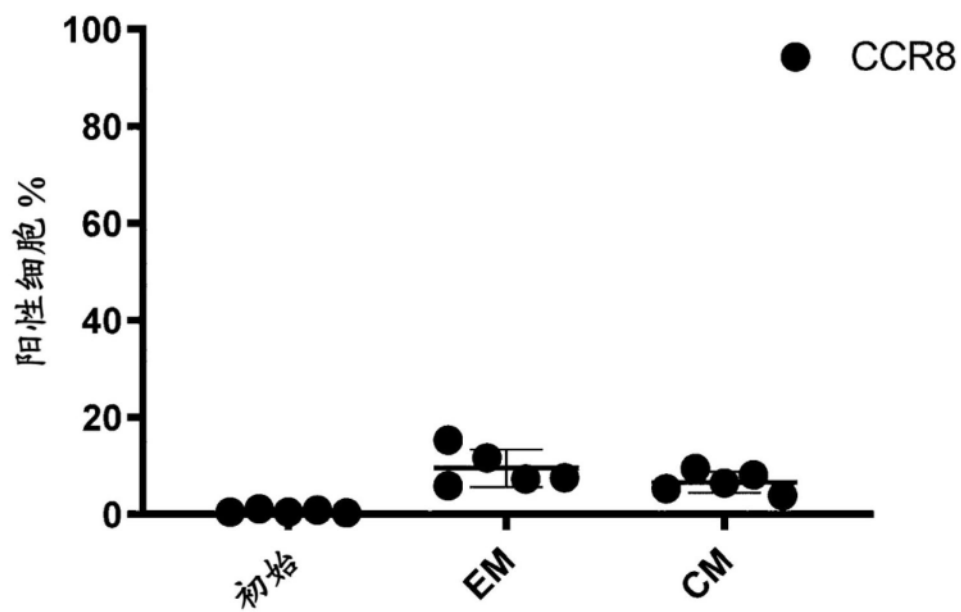


图4C

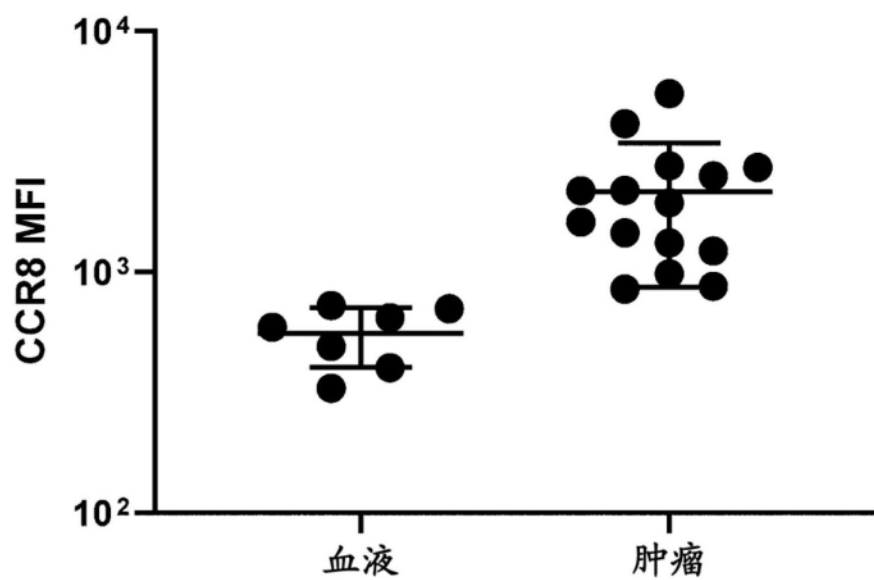


图4D

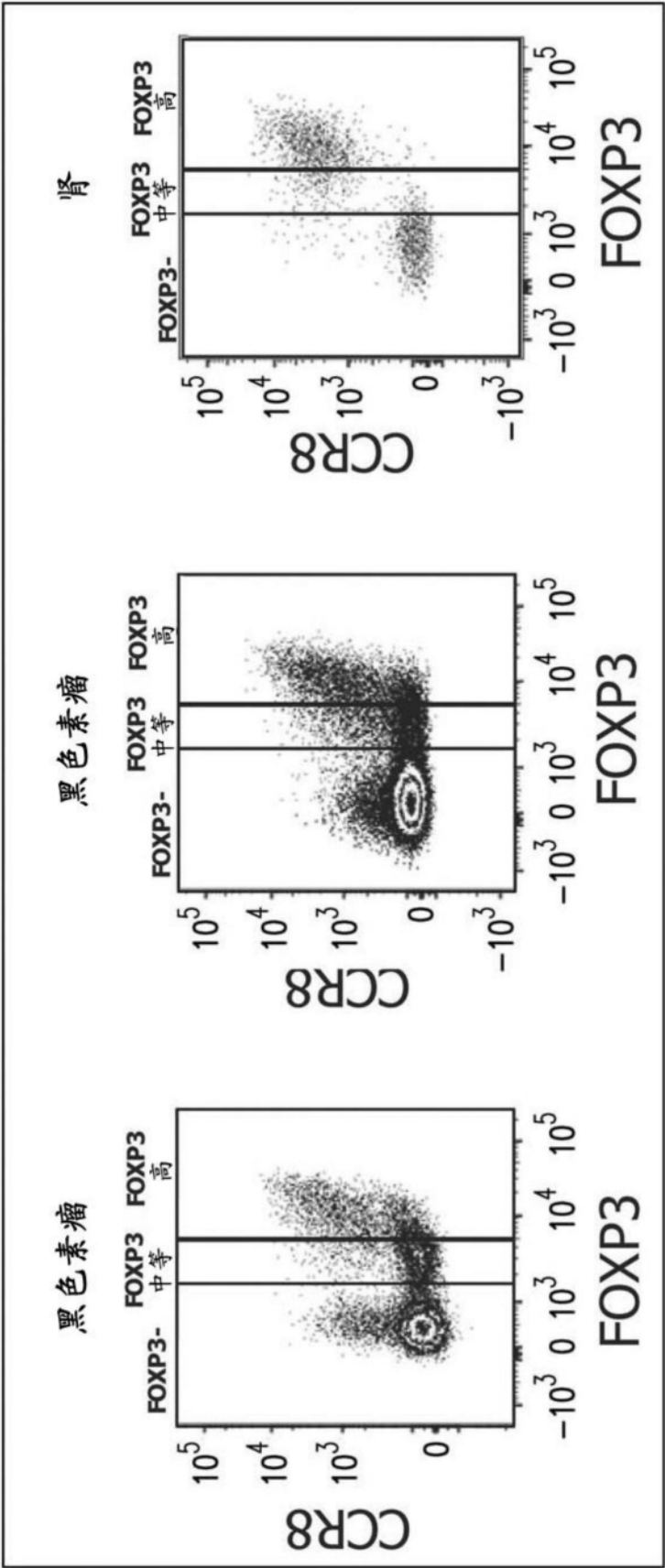


图5

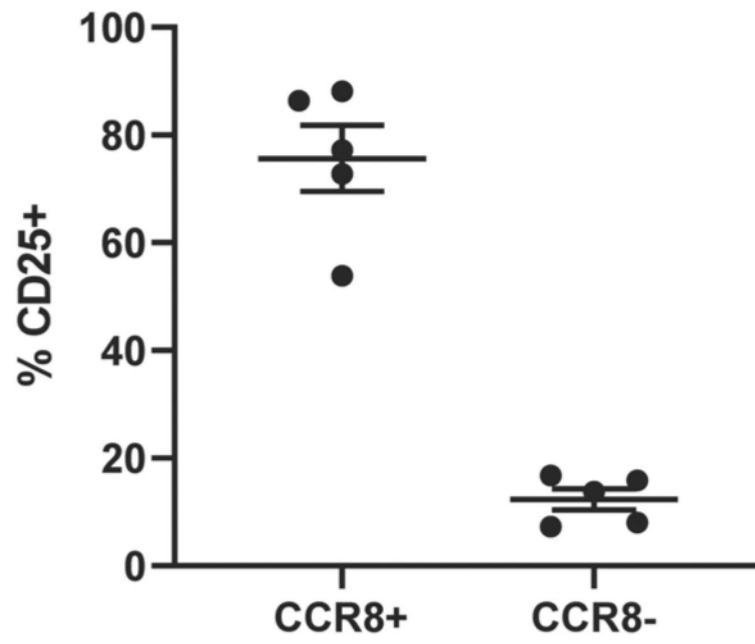


图6A

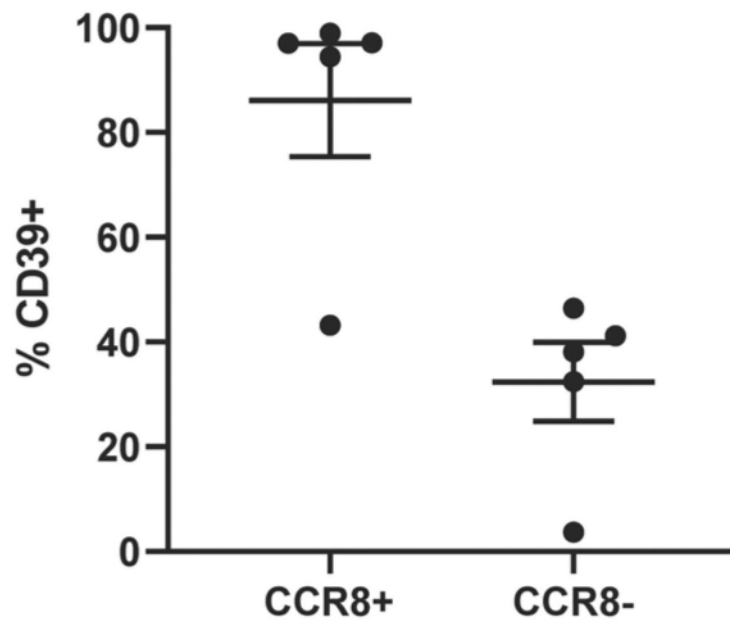


图6B

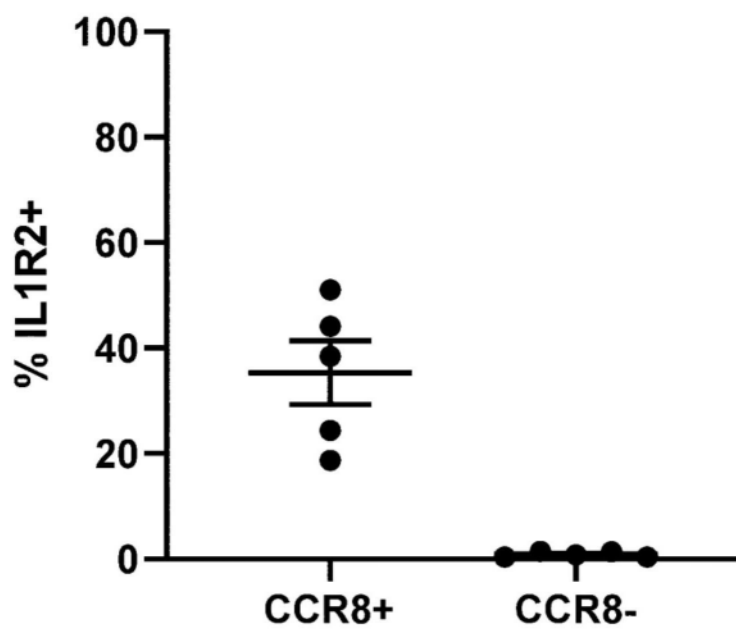


图6C

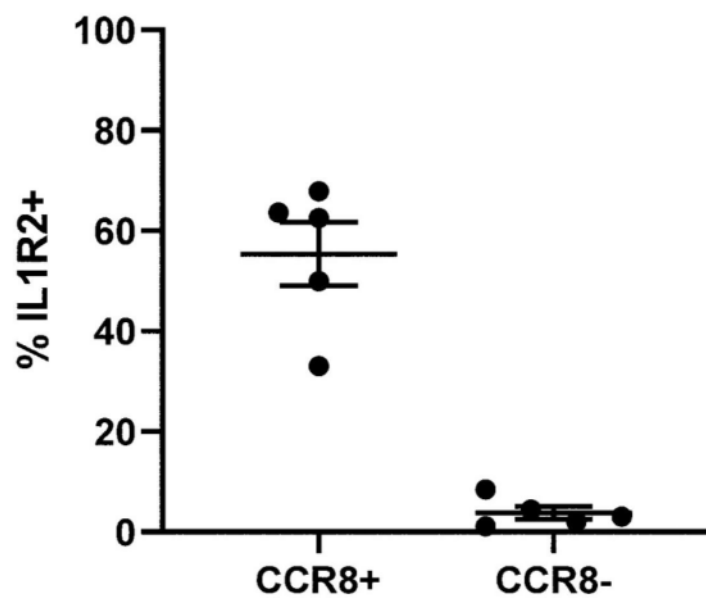


图6D

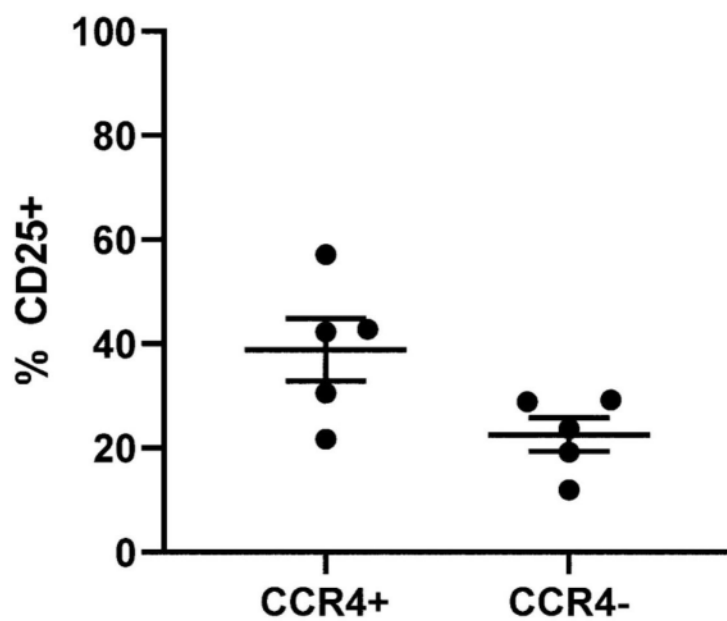


图7A

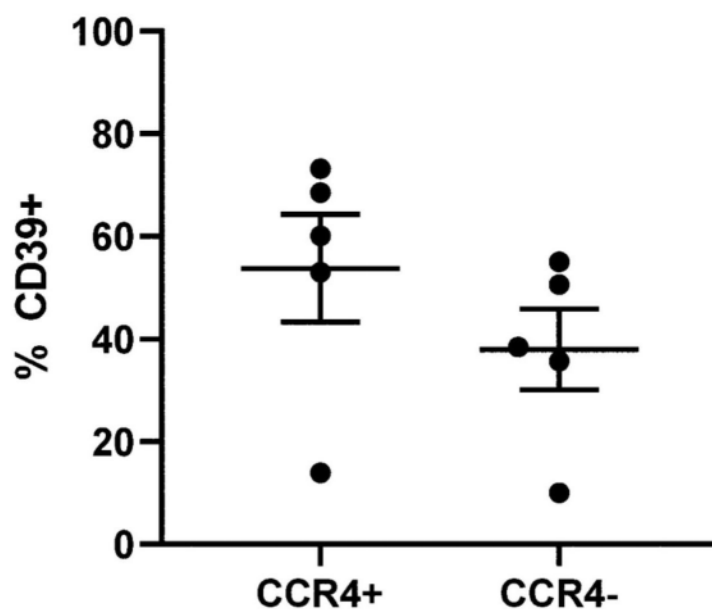


图7B

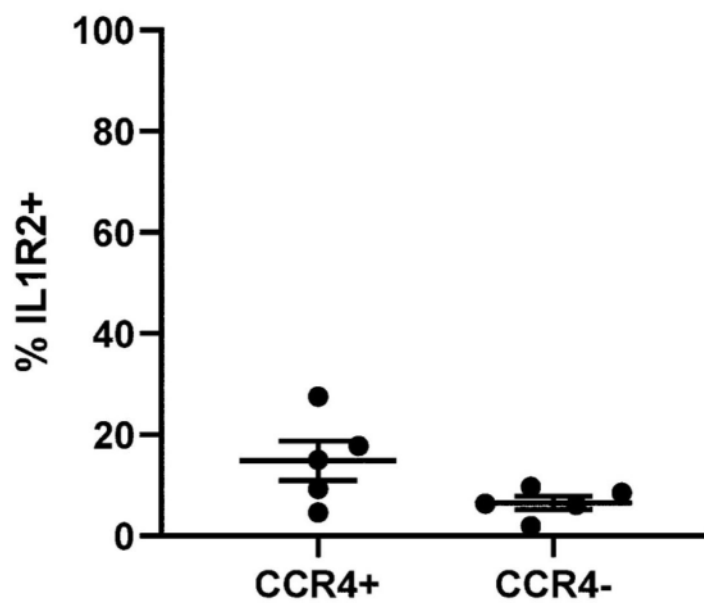


图7C

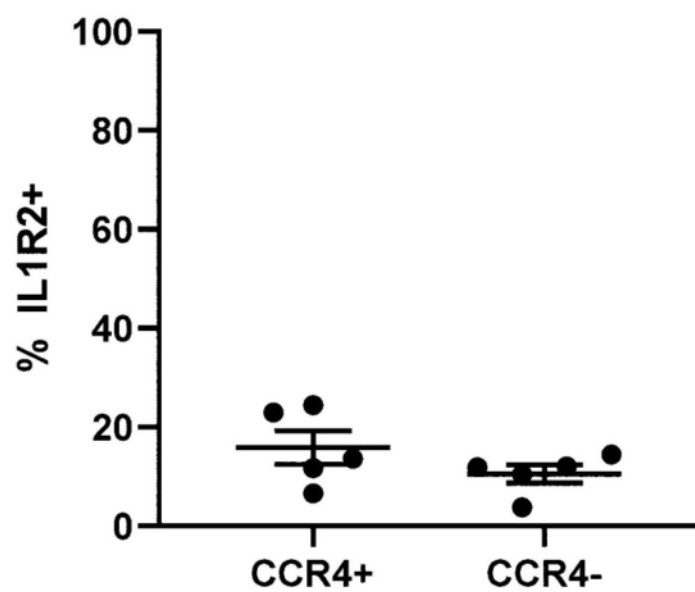


图7D

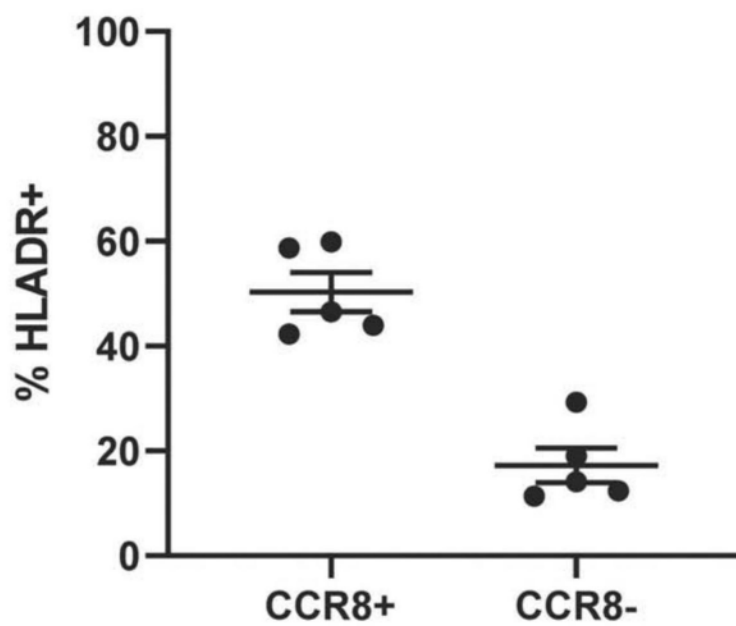


图8A

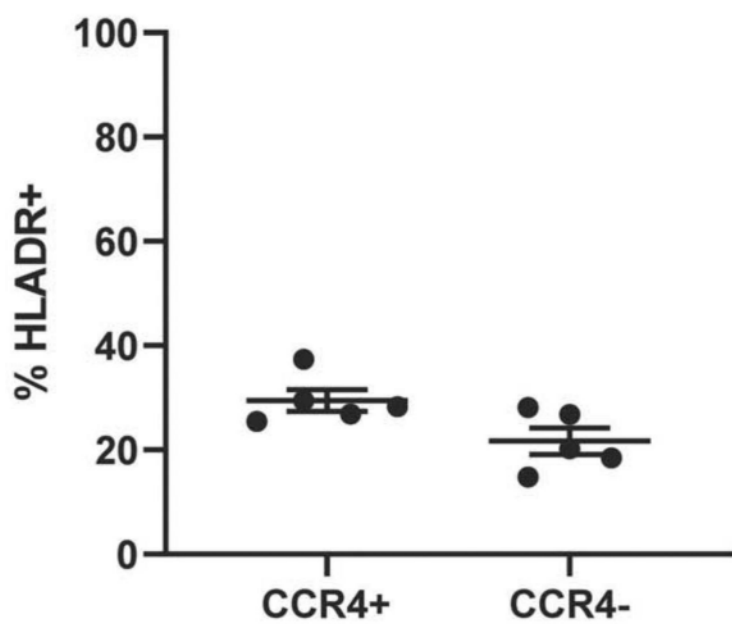


图8B

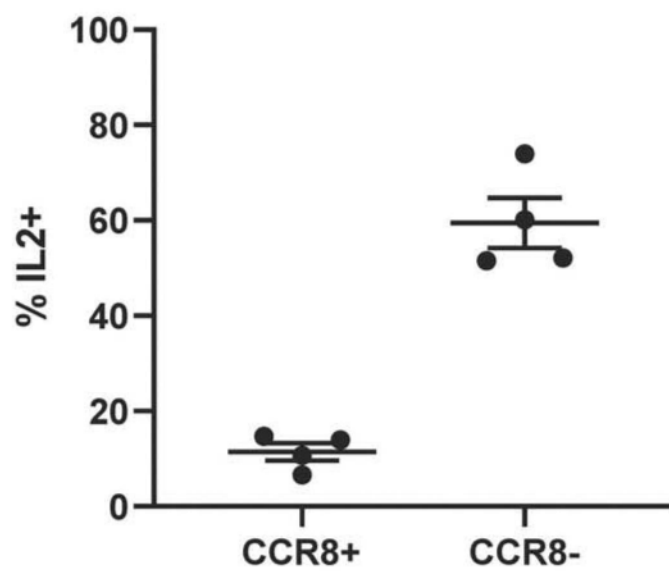


图9A

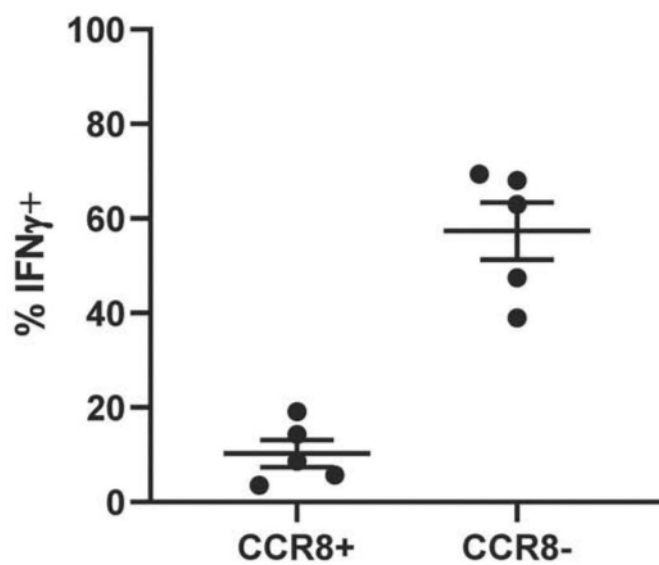


图9B

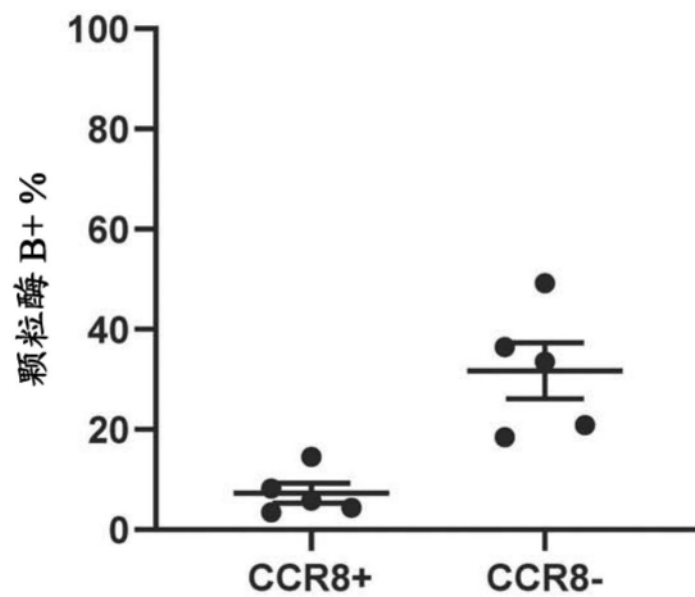


图9C

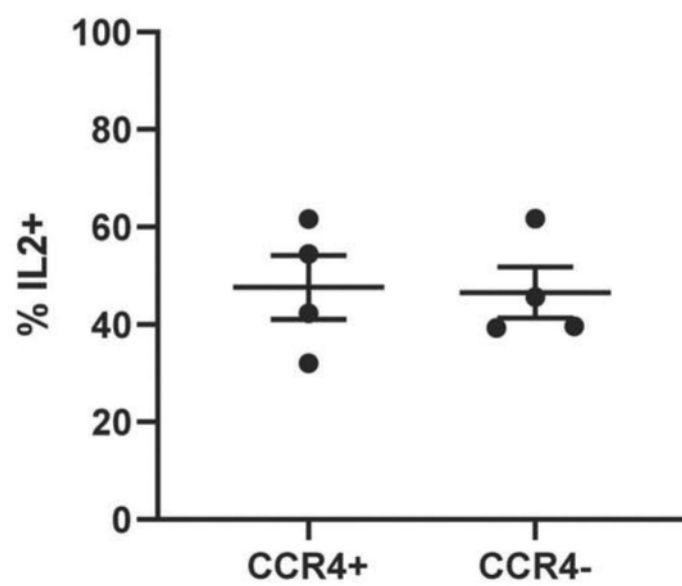


图10A

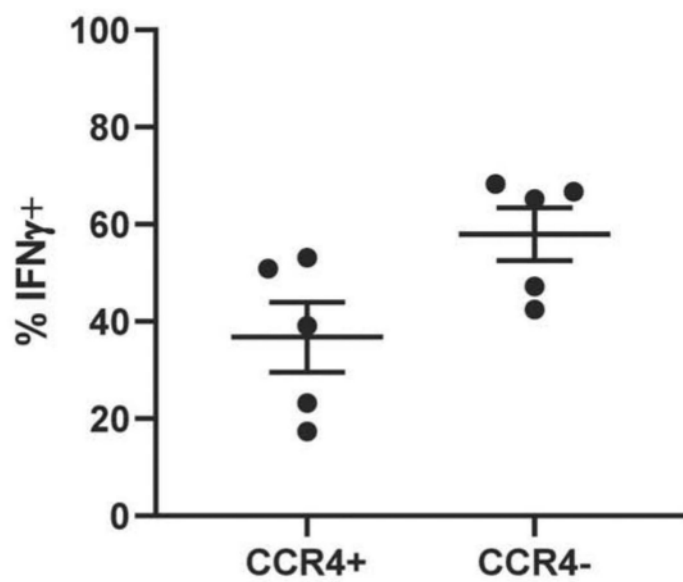


图10B

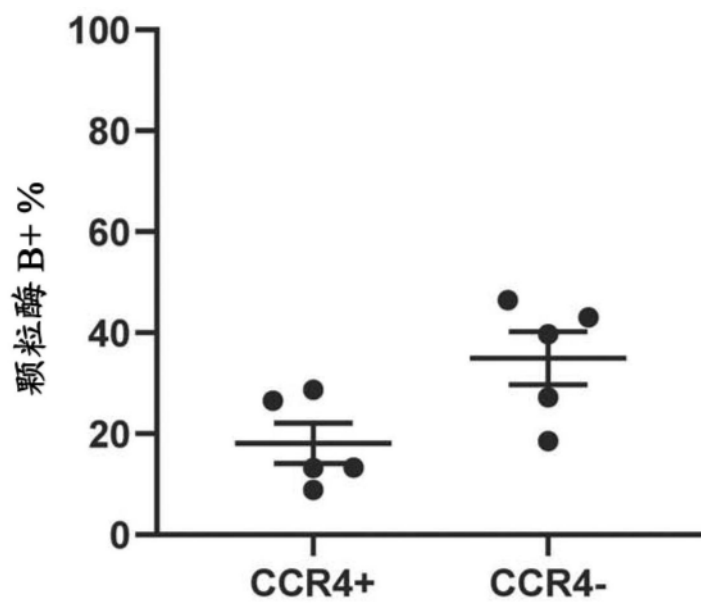


图10C

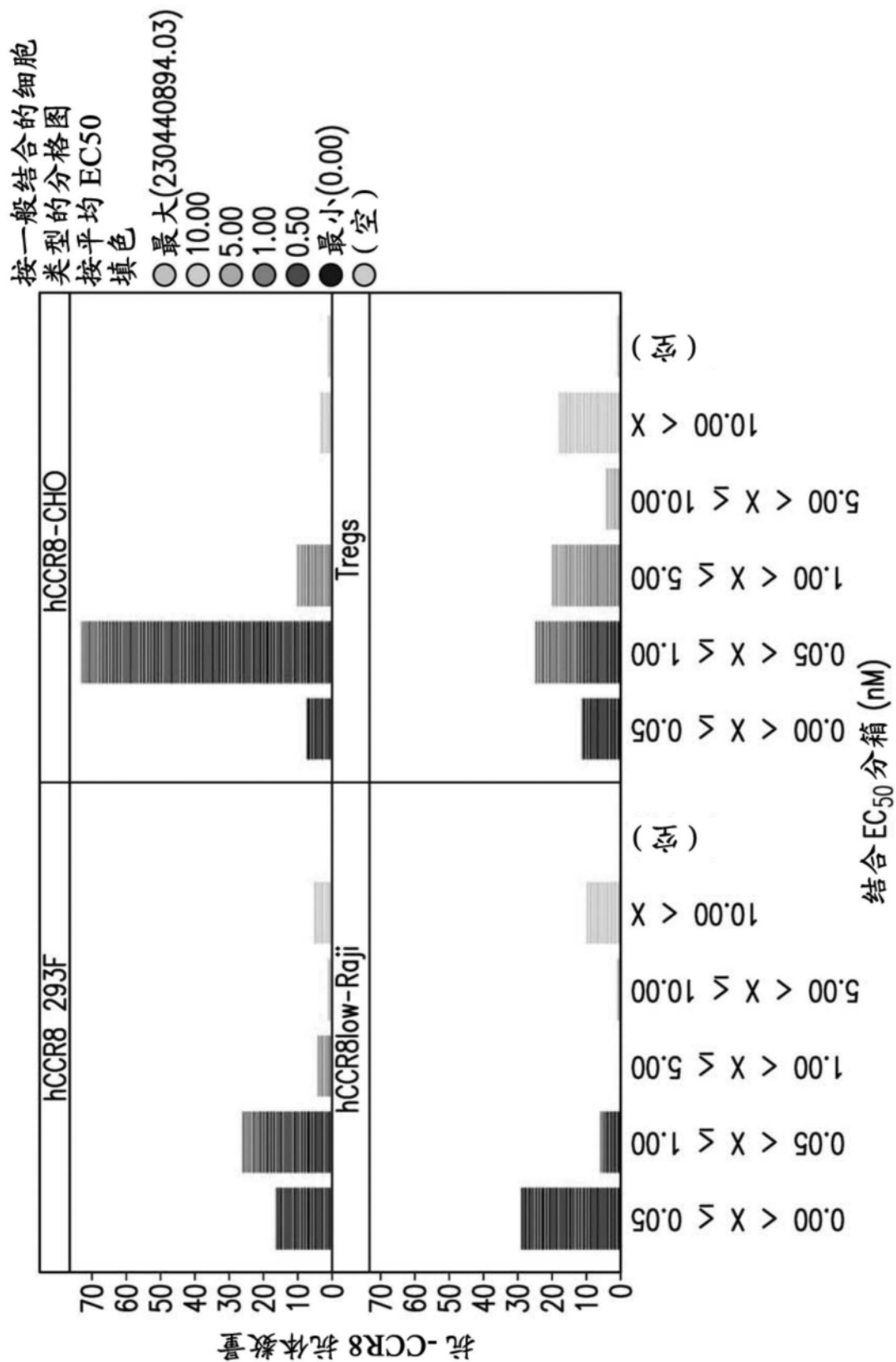


图11A

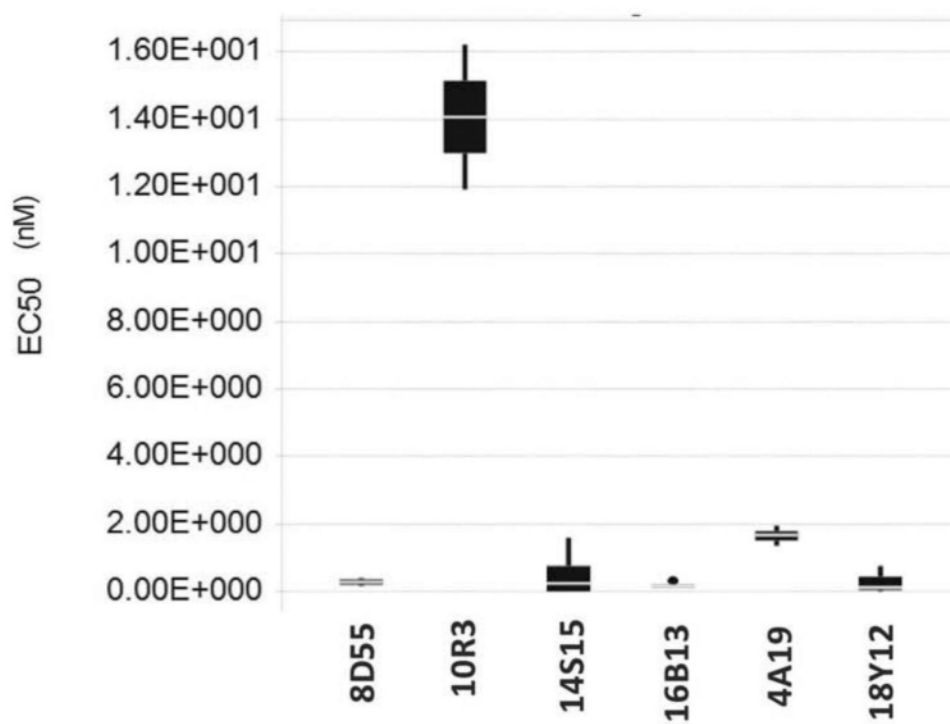


图11B

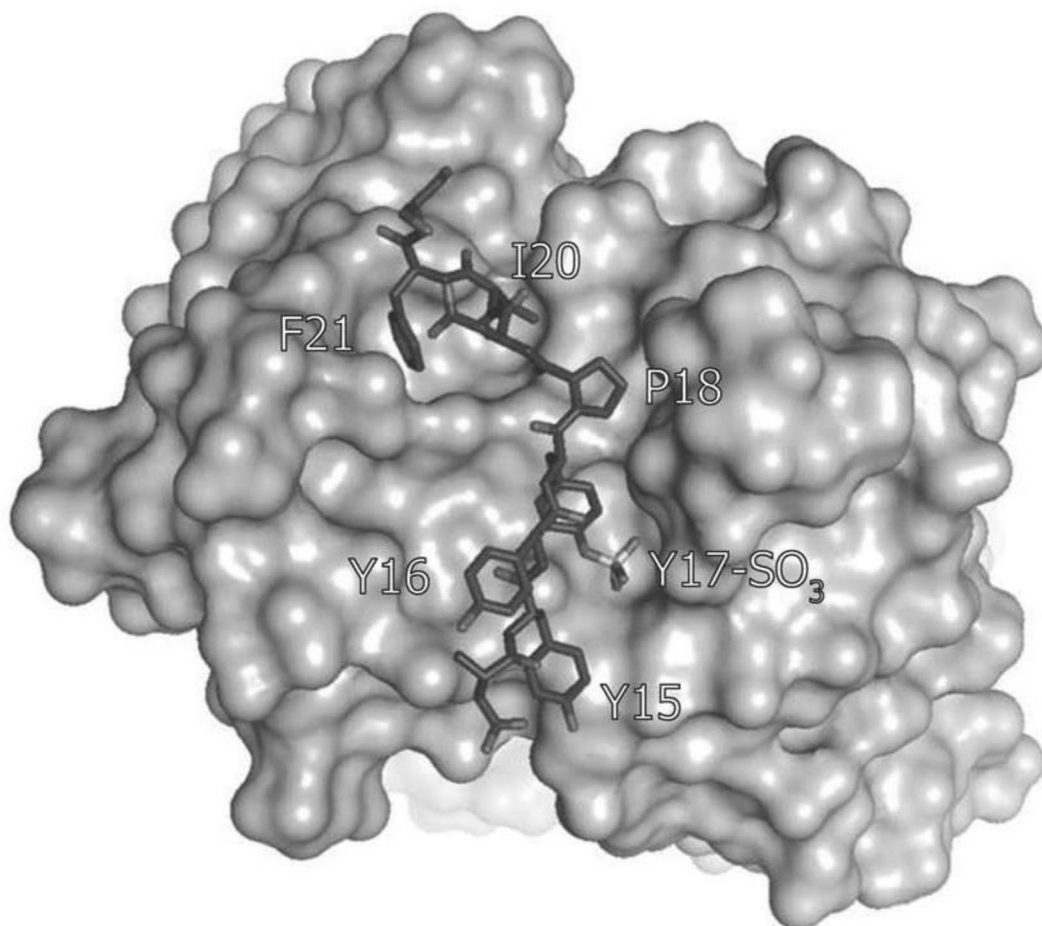


图12A

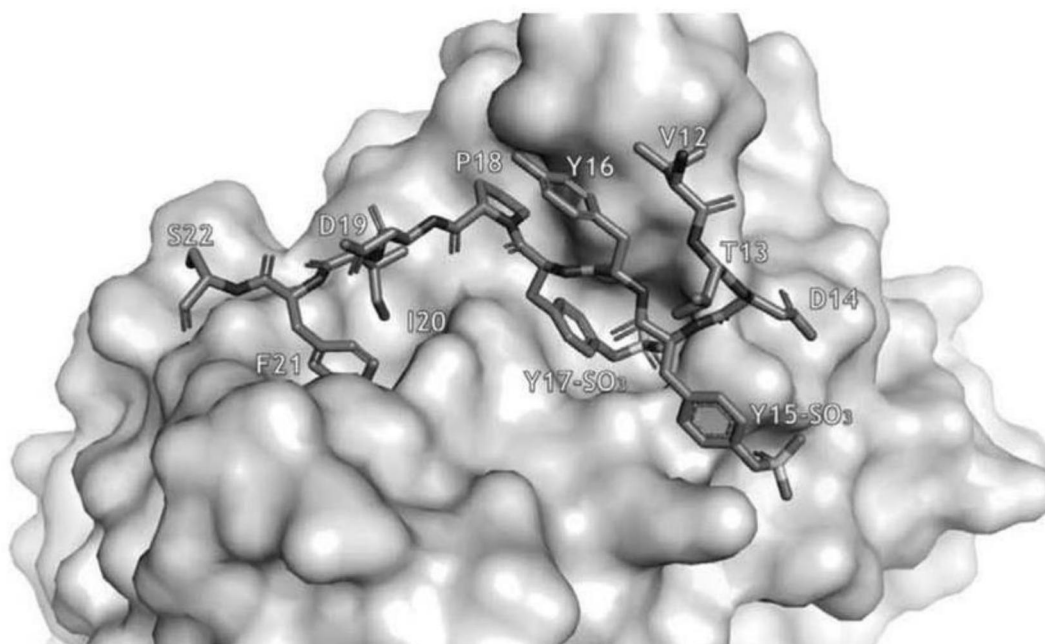


图12B

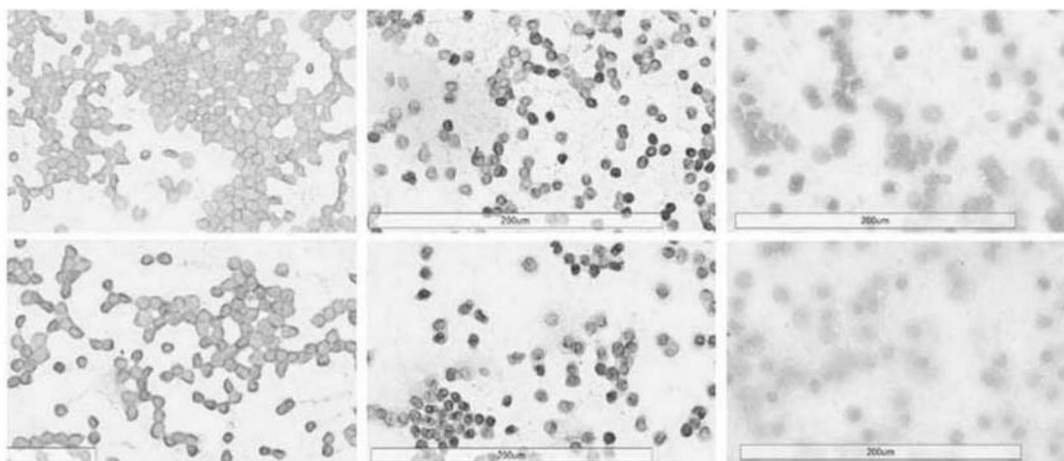


图13A

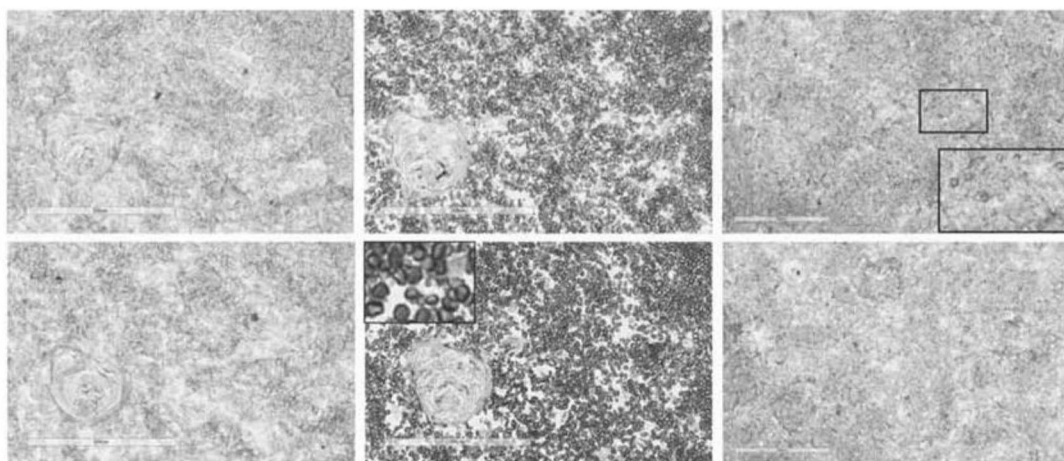


图13B

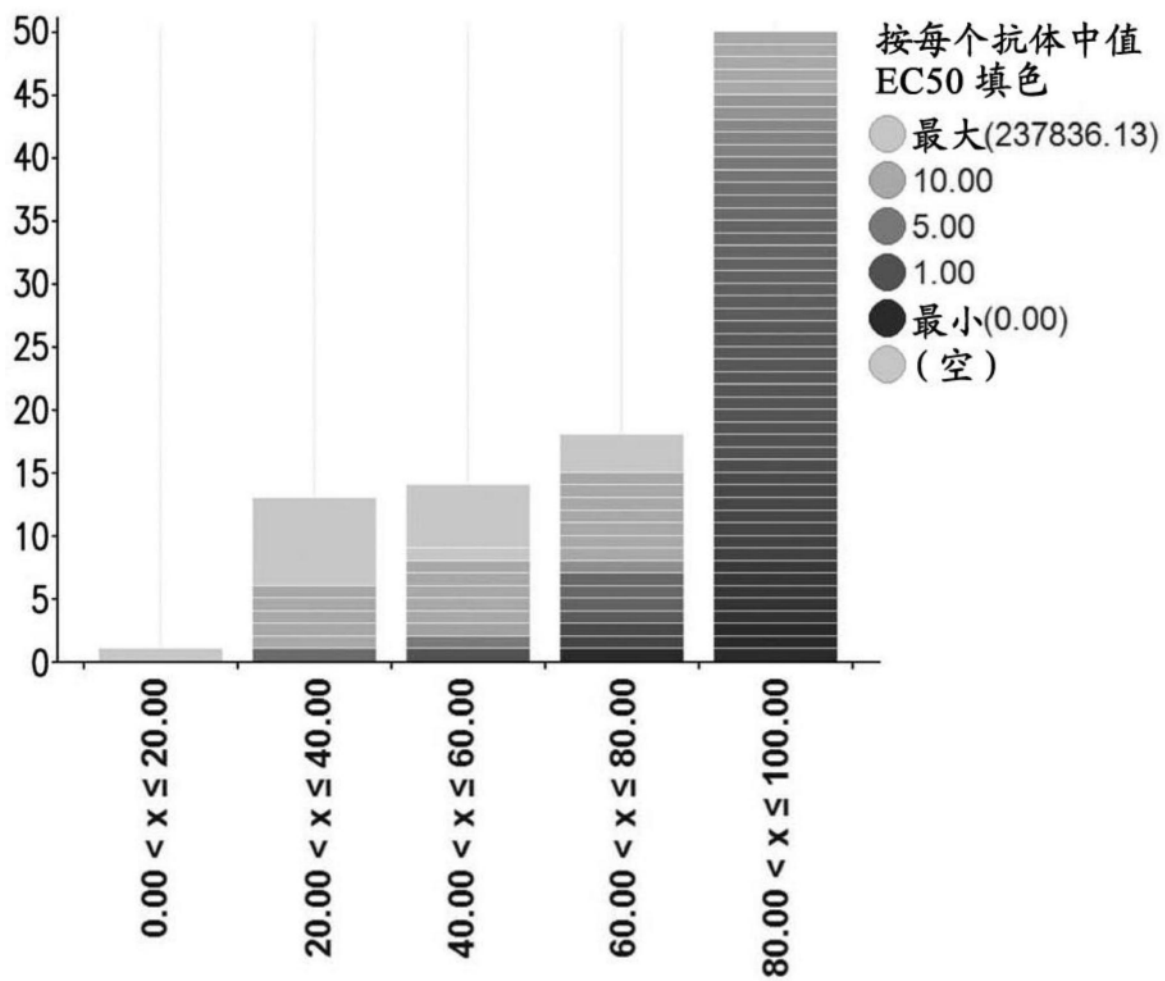


图14A

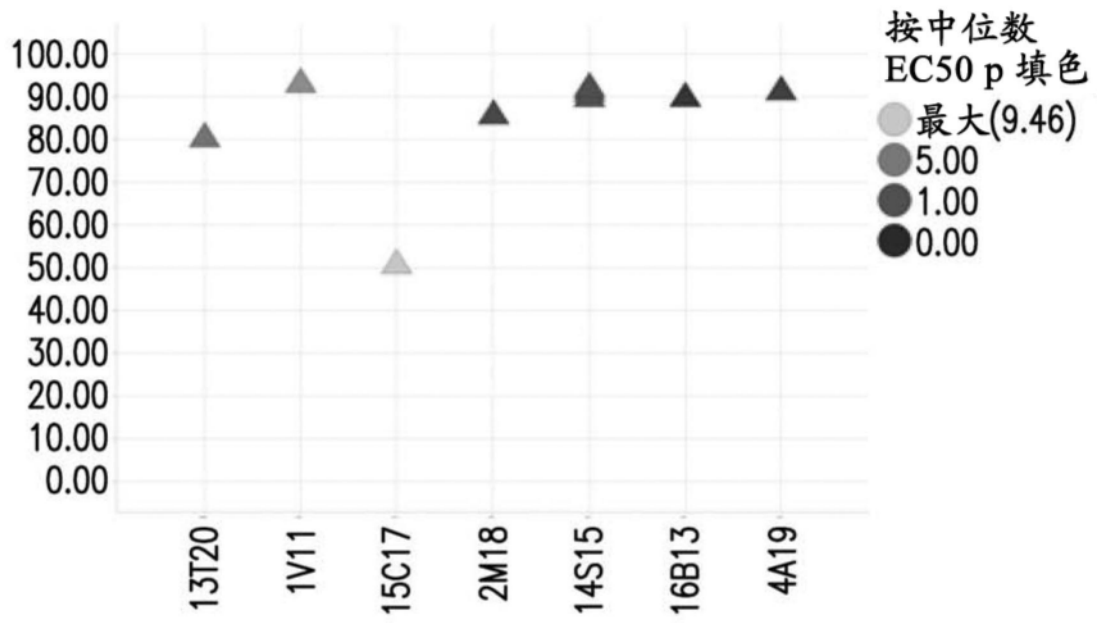


图14B

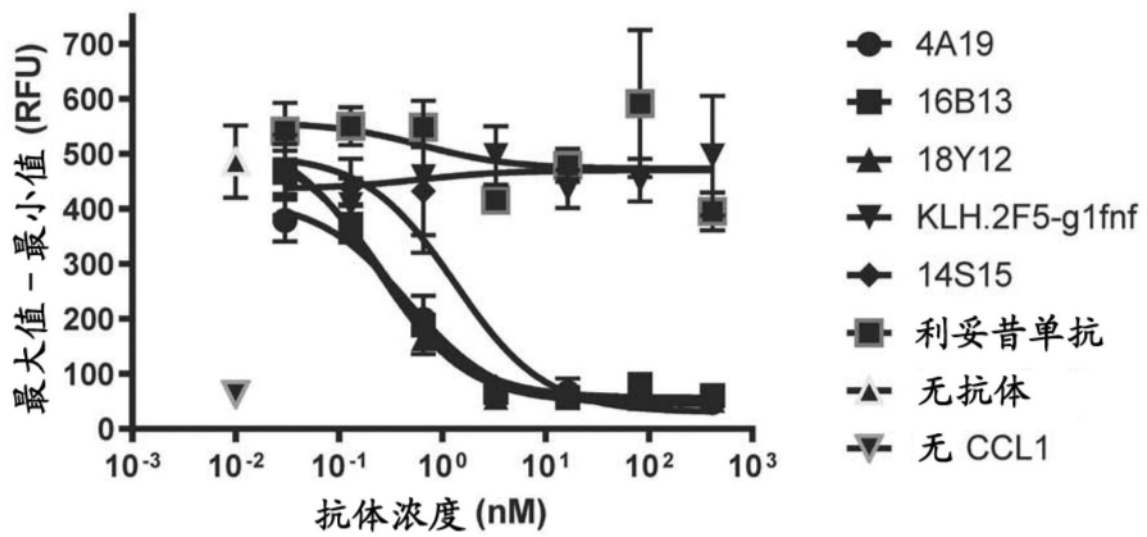


图14C

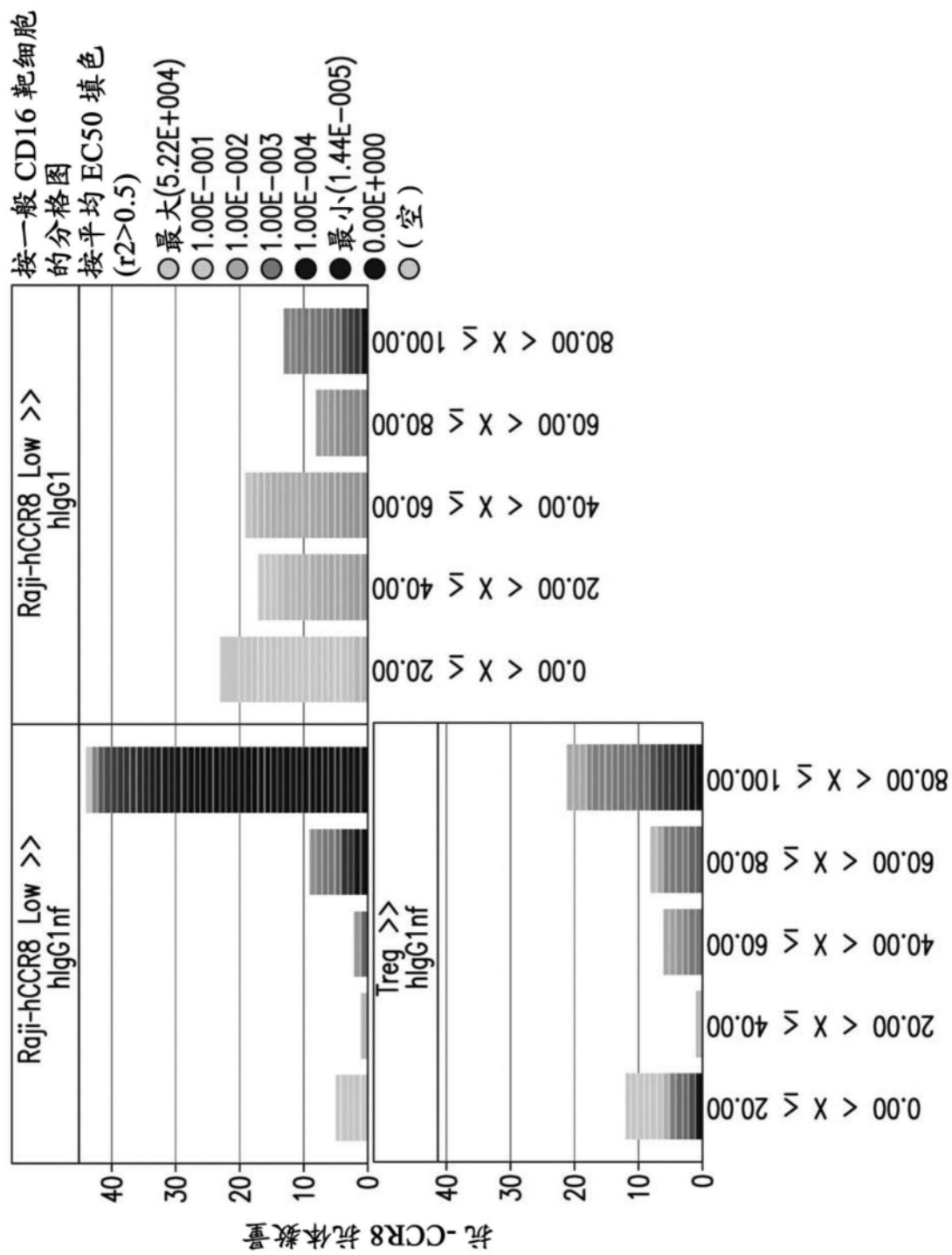


图15A

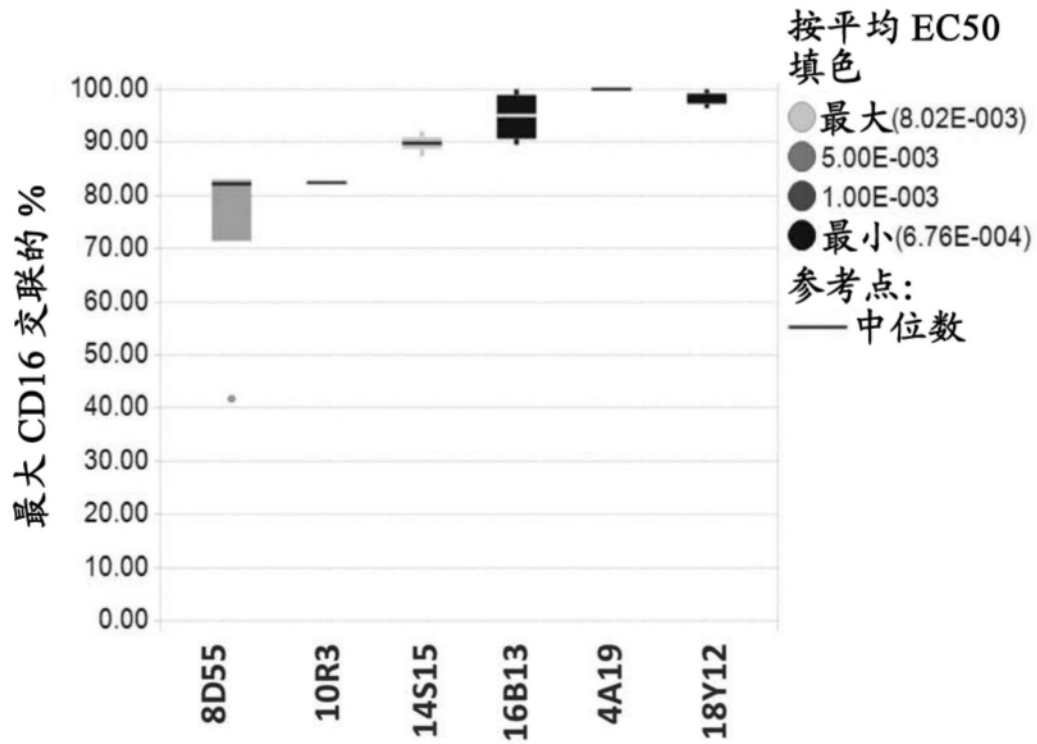


图15B

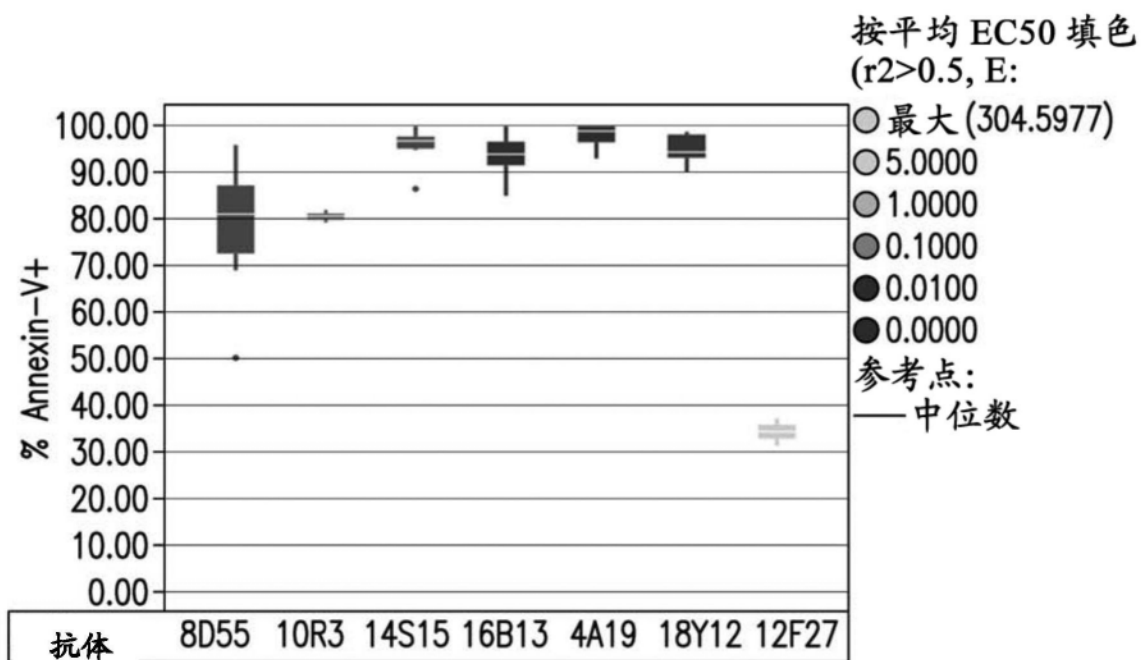


图16

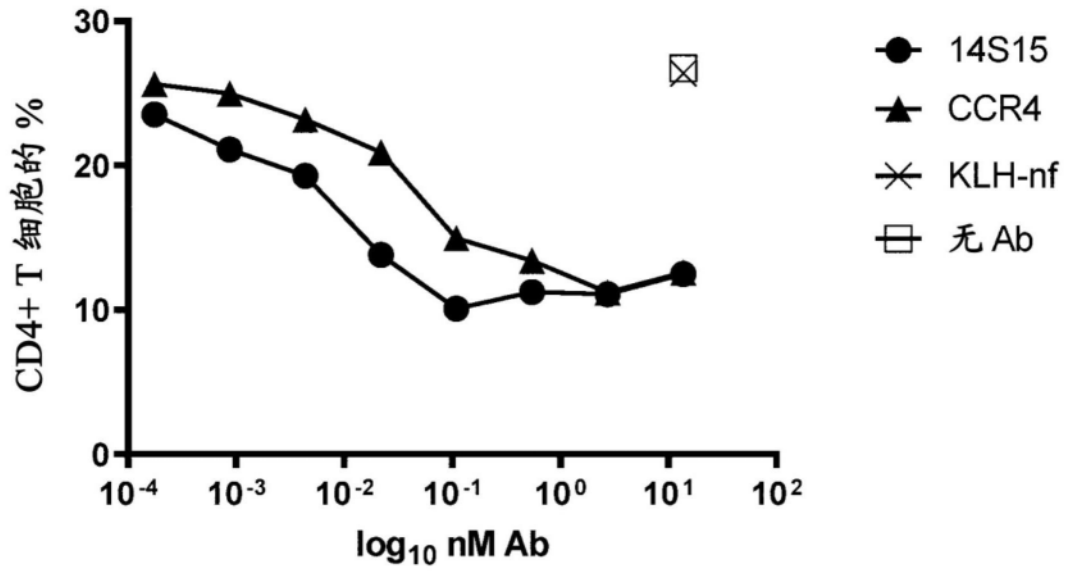


图17A

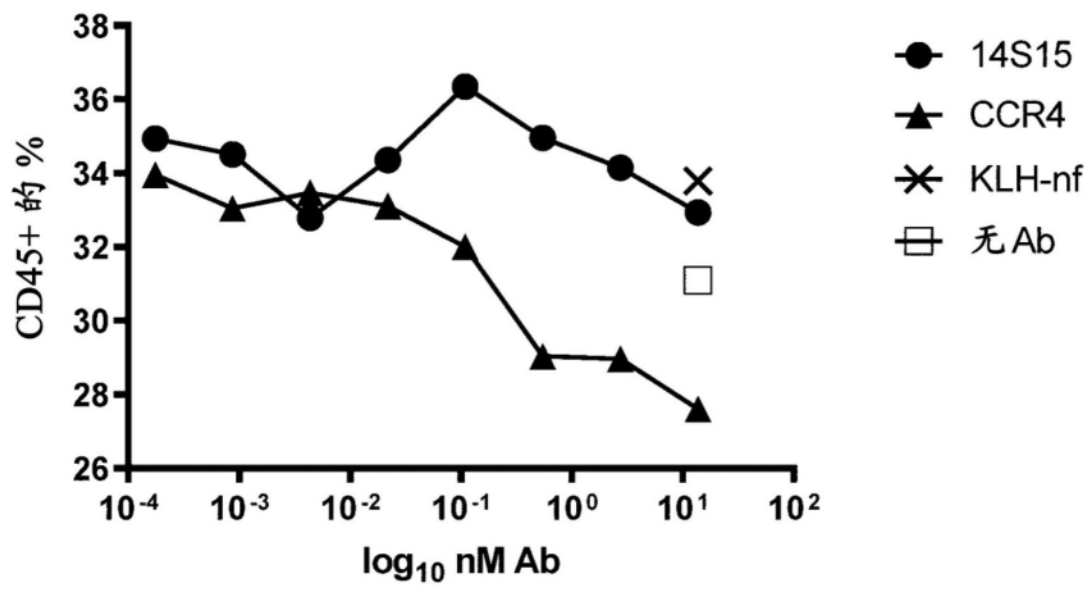


图17B

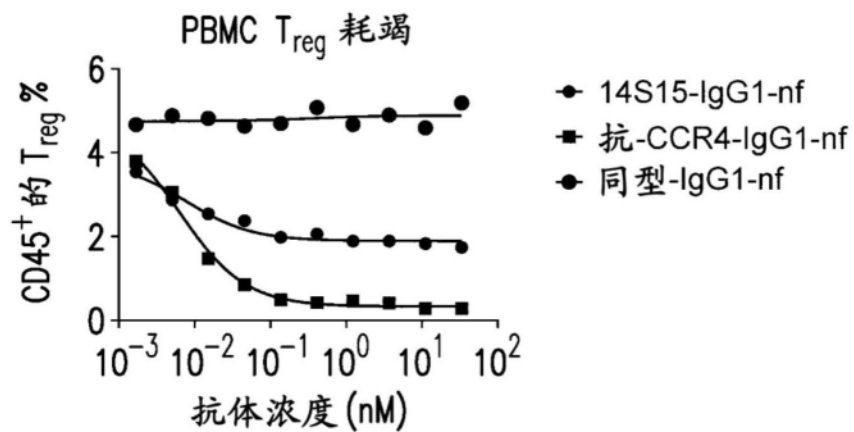


图18A

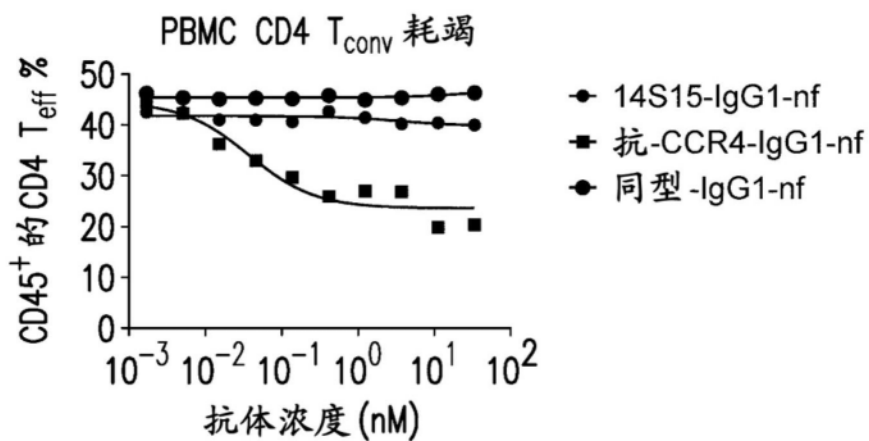


图18B

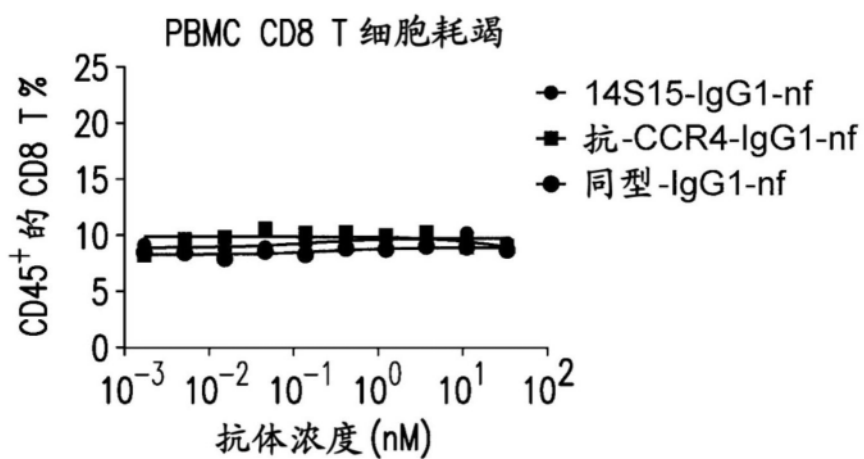


图18C

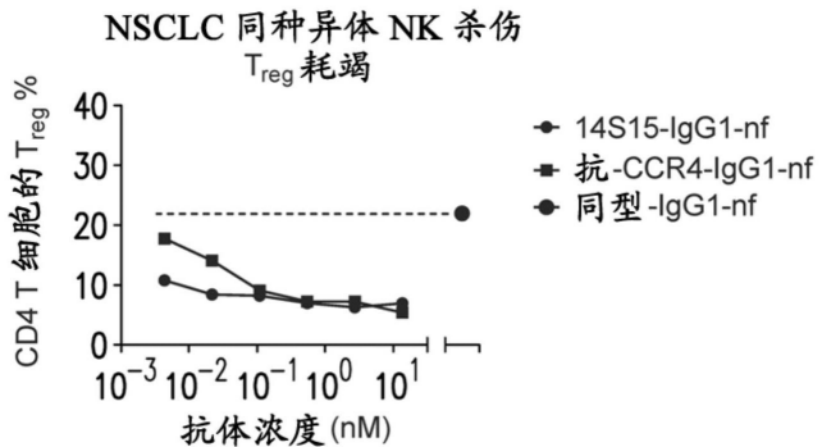


图18D

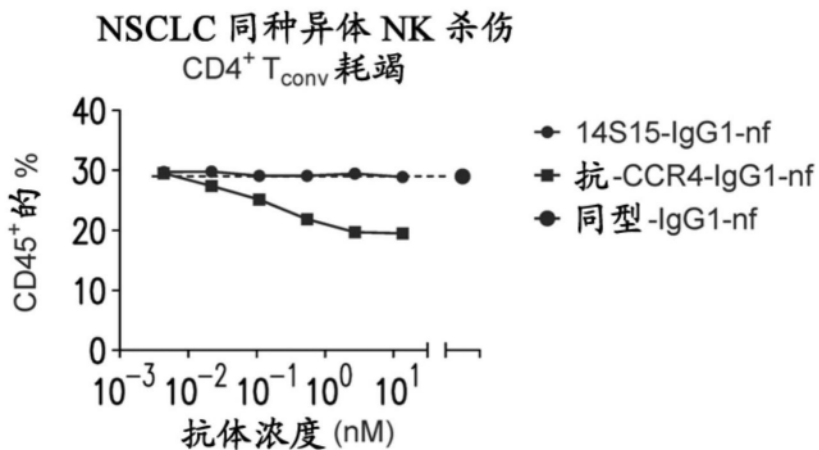


图18E

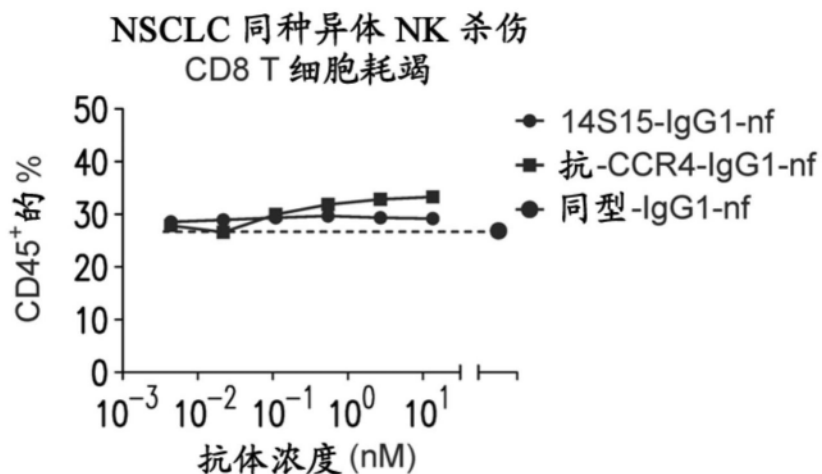


图18F

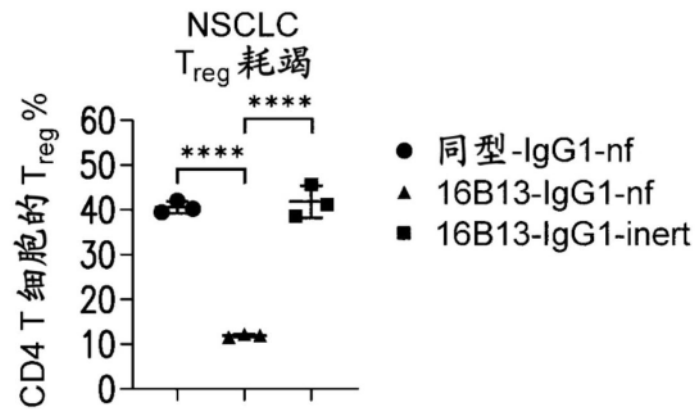


图18G

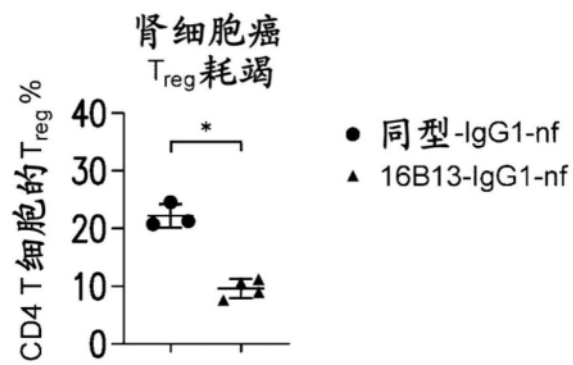


图18H

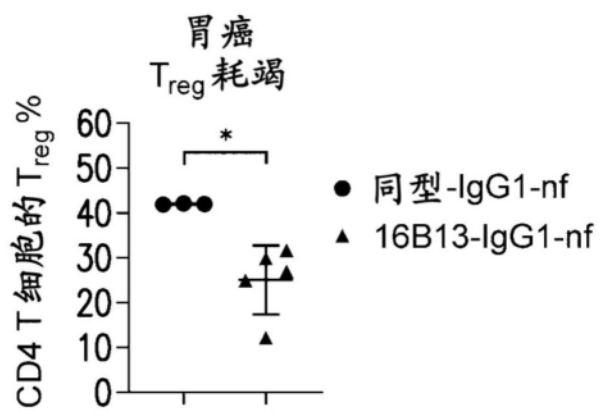


图18I

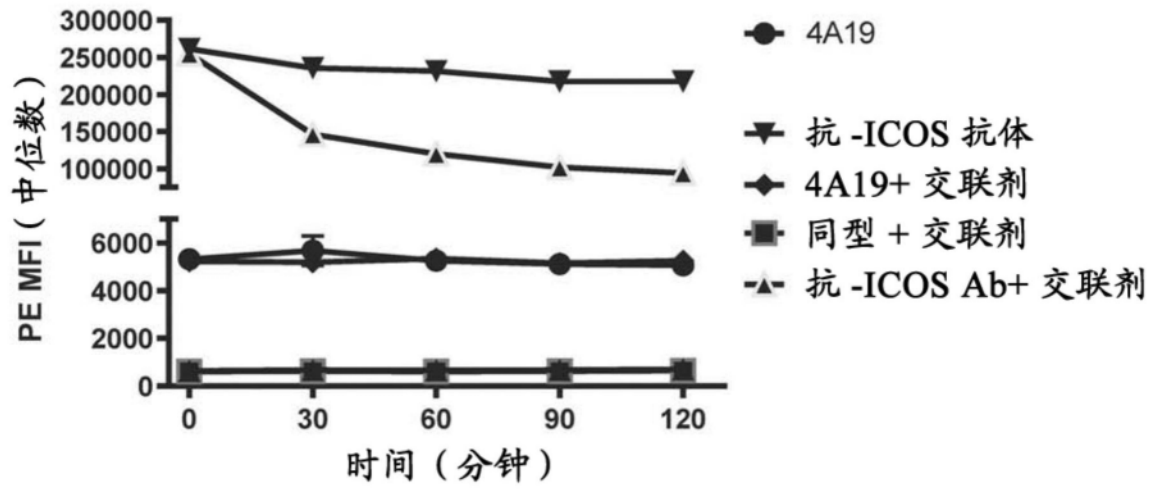


图19

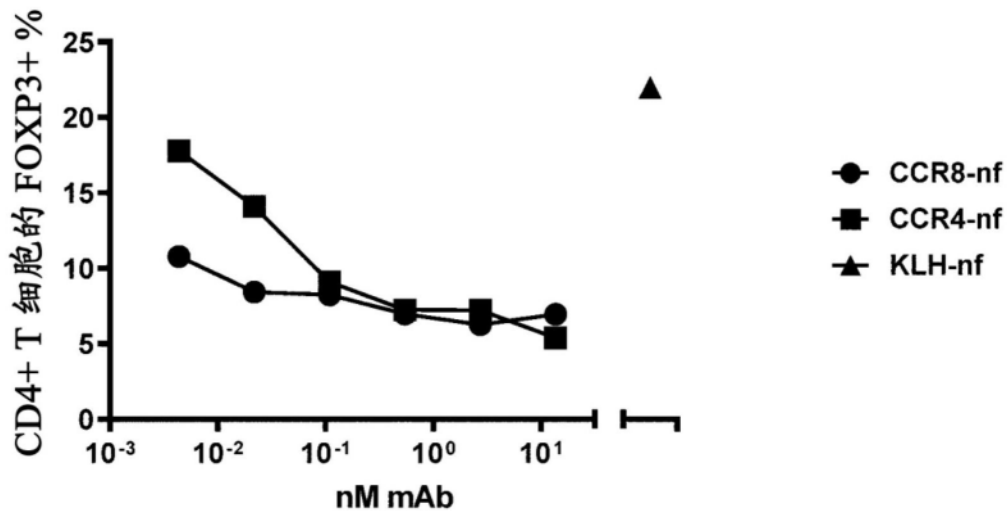


图20A

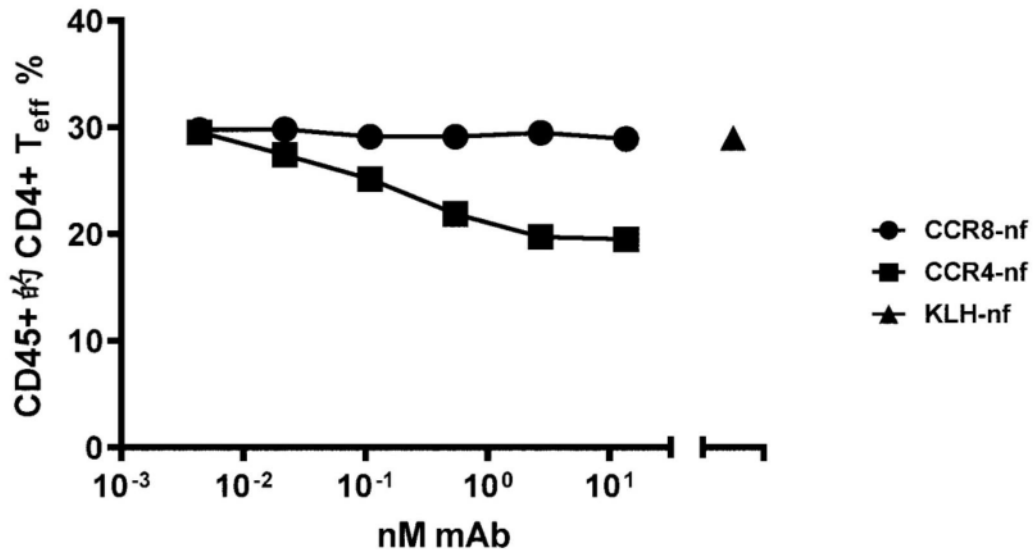


图20B

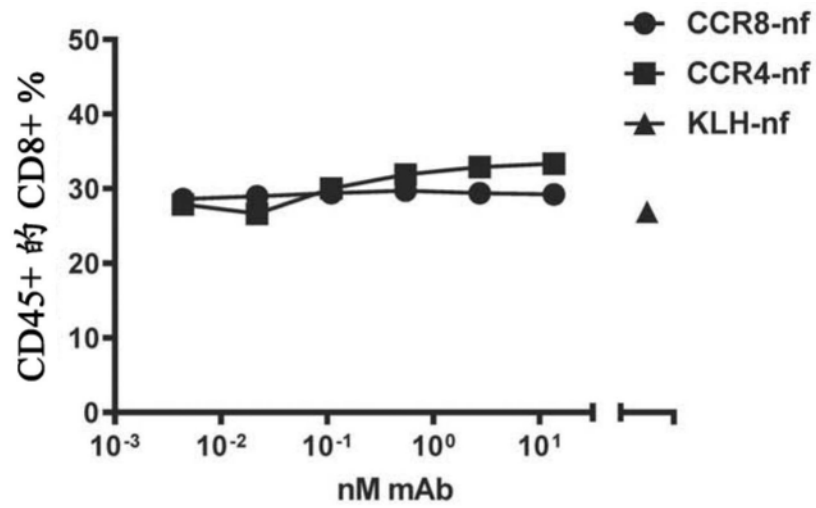


图20C

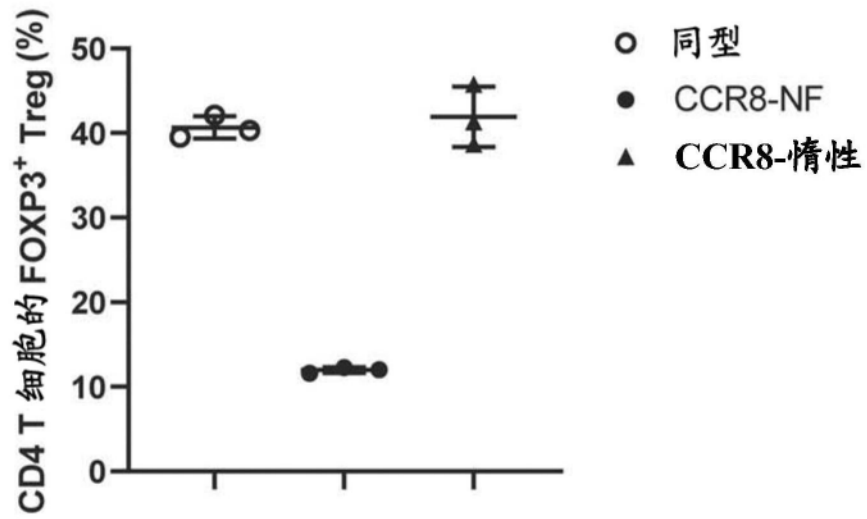


图20D

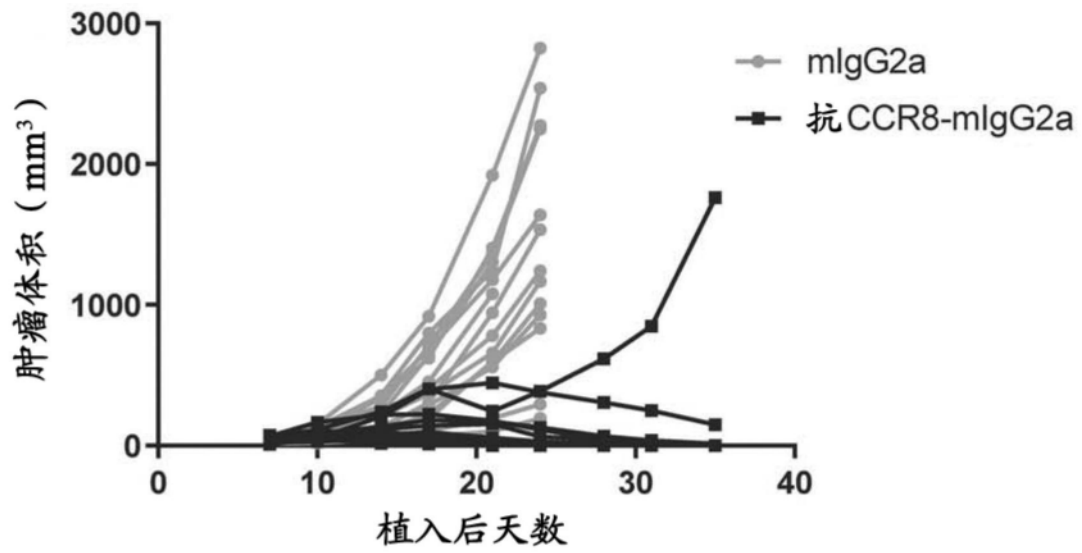


图21A

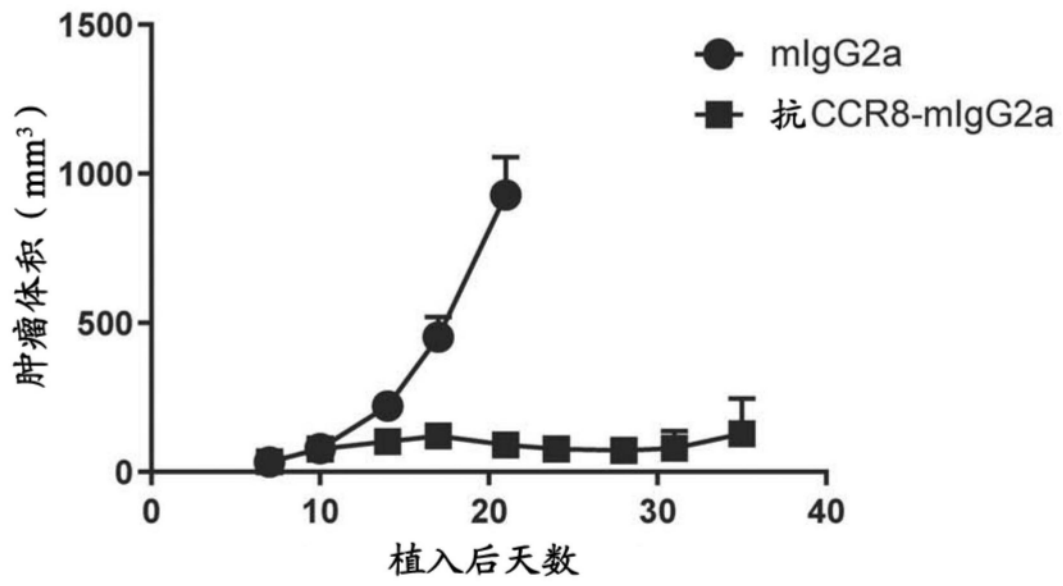


图21B

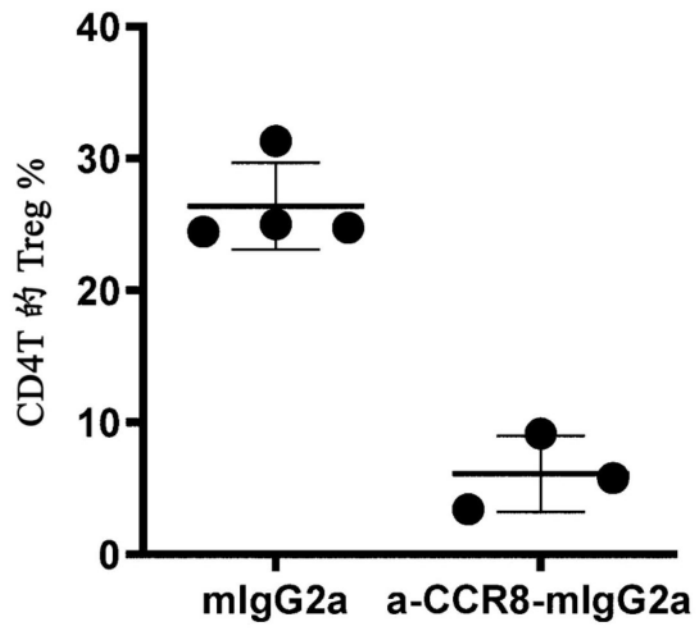


图21C

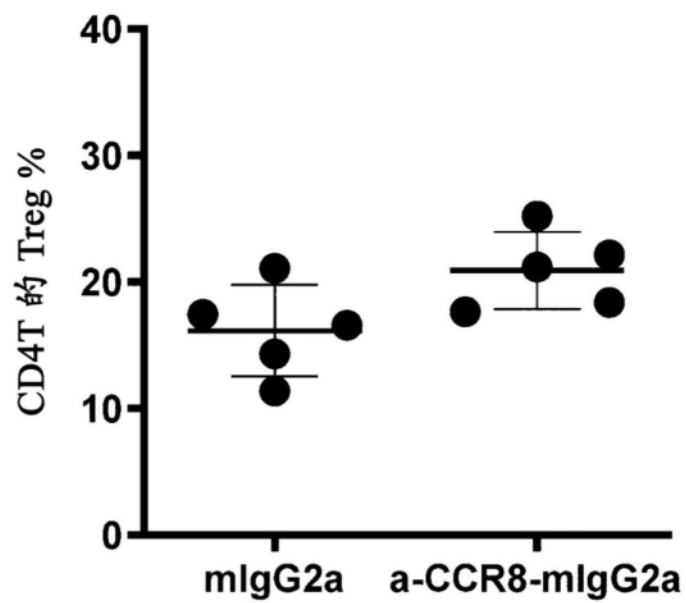


图21D

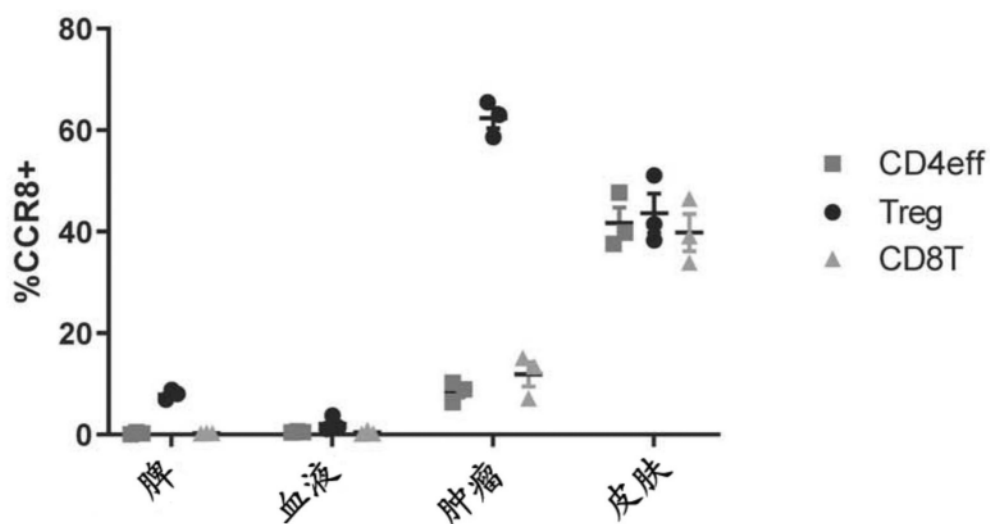


图22A

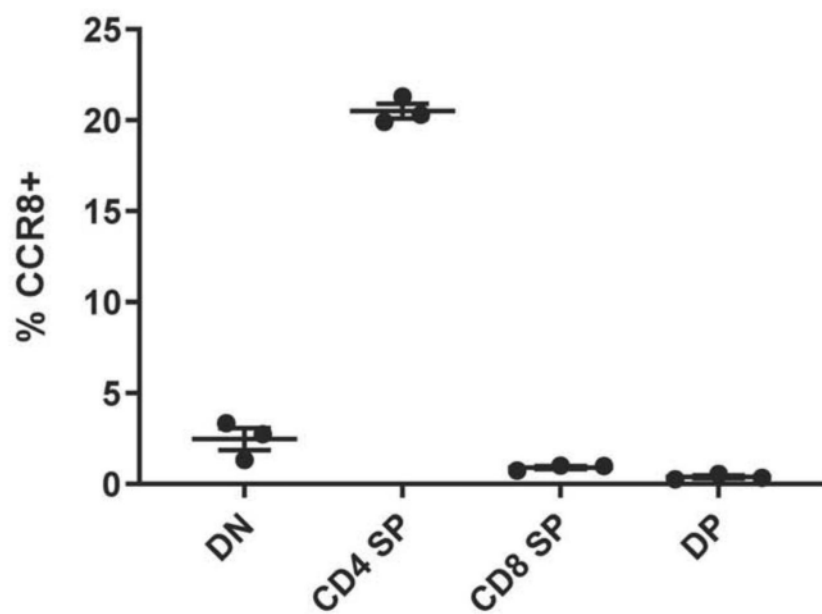


图22B

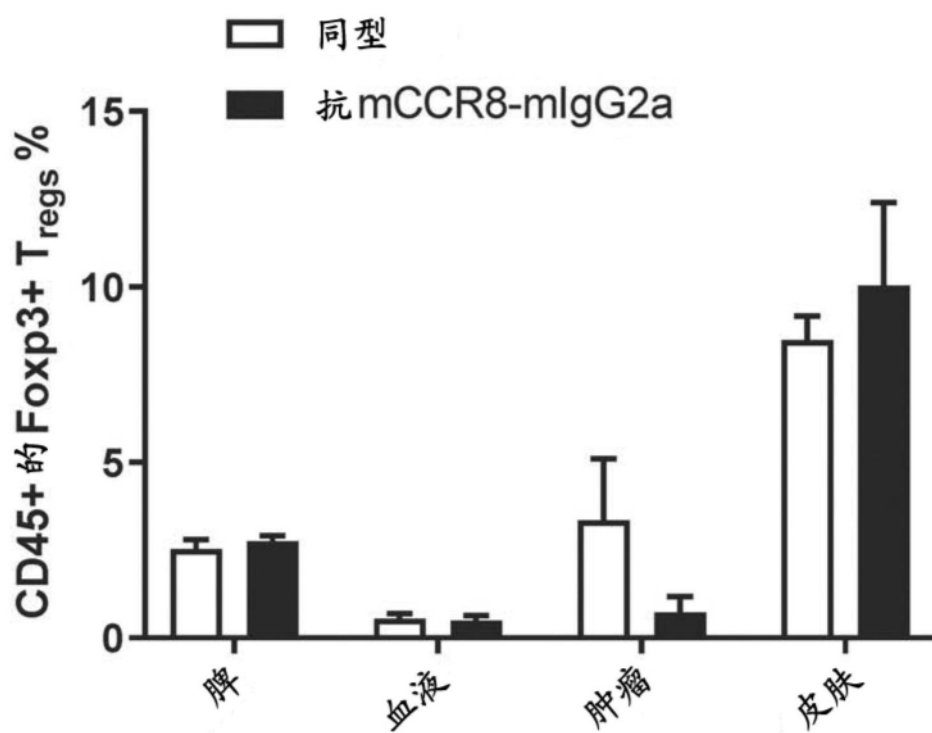


图22C

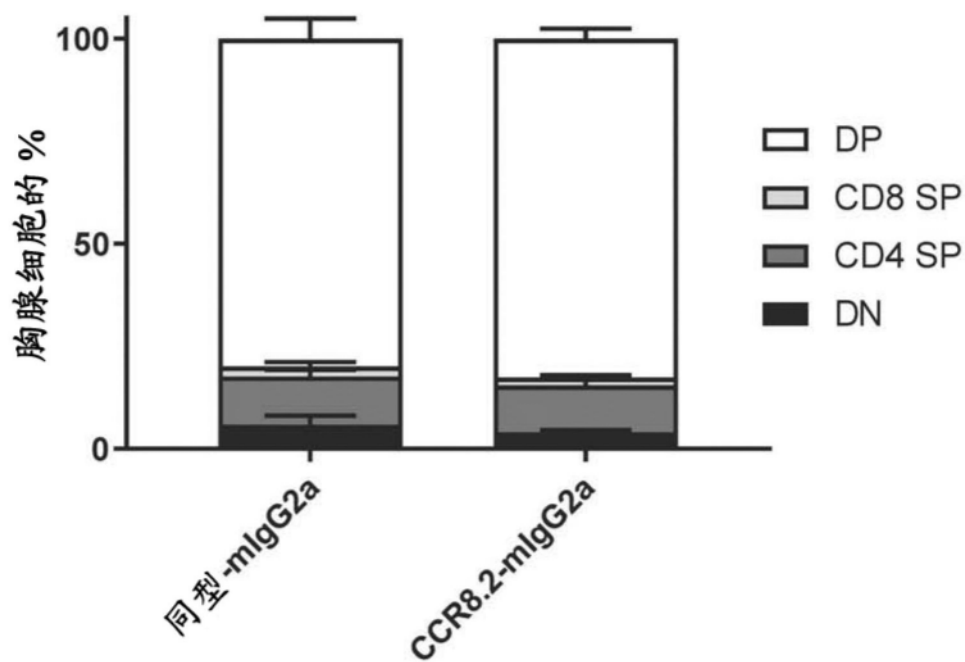


图22D

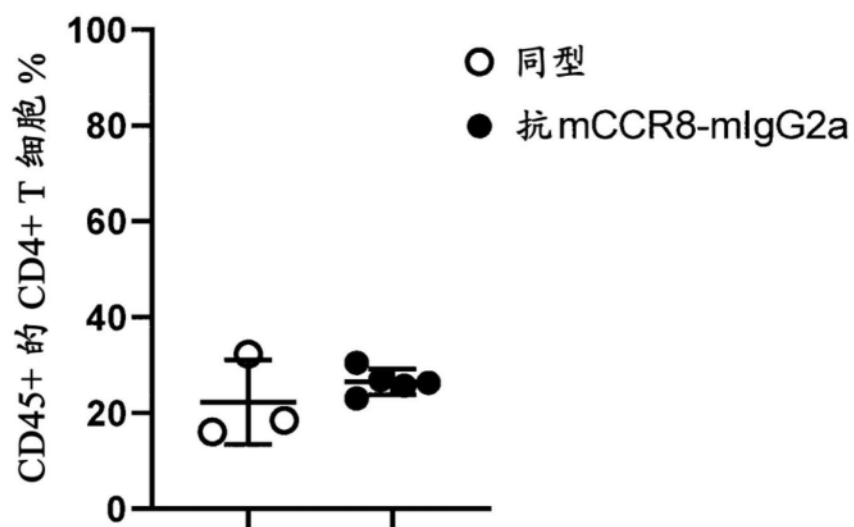


图22E

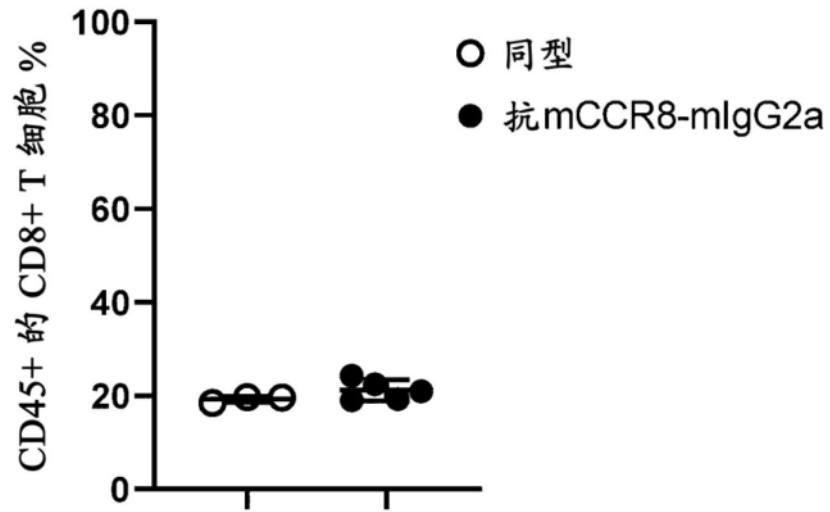


图22F

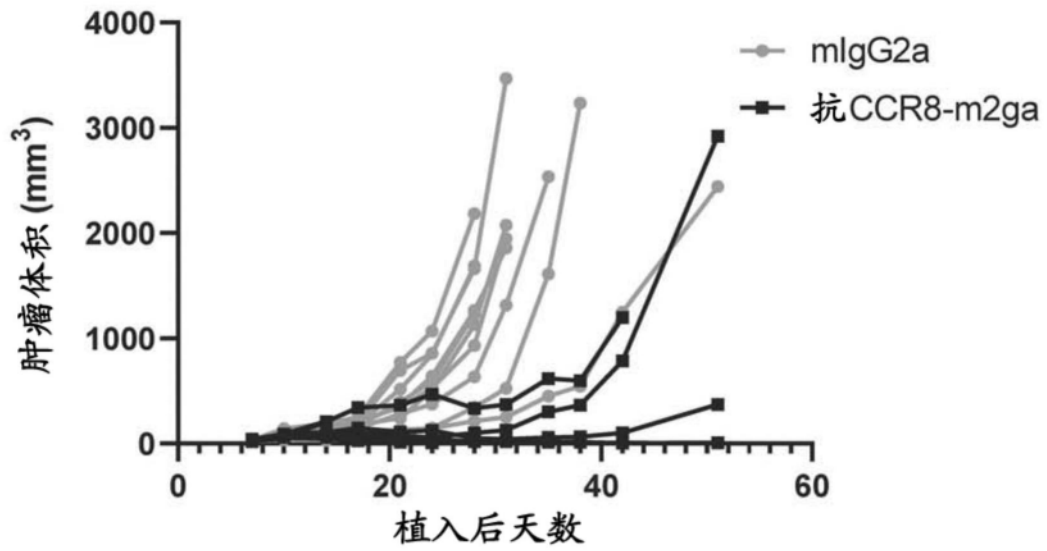


图23A

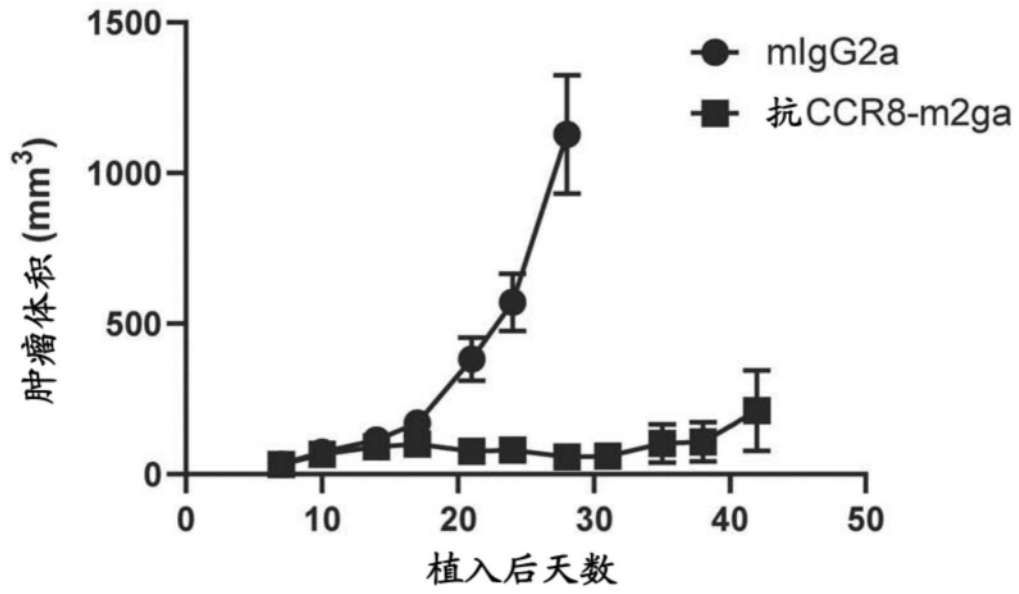


图23B

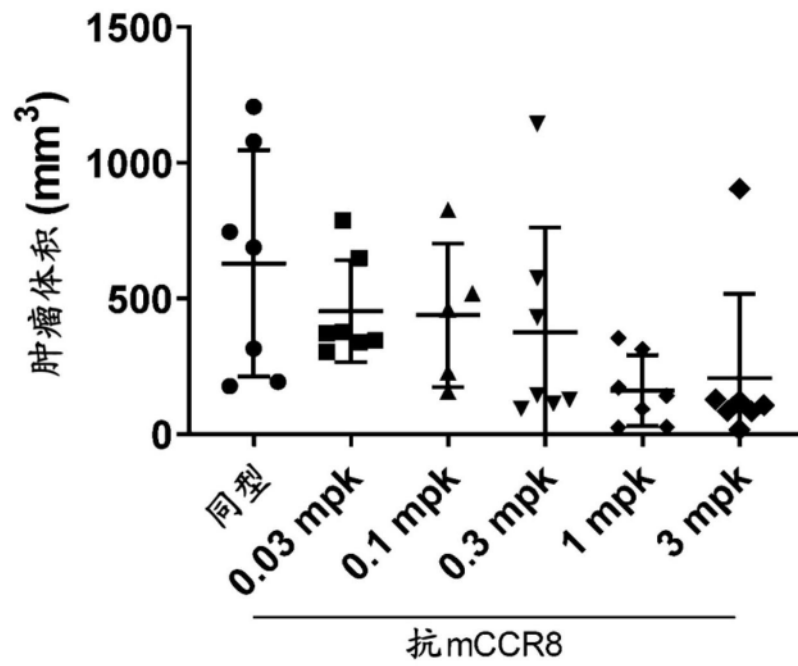


图24A

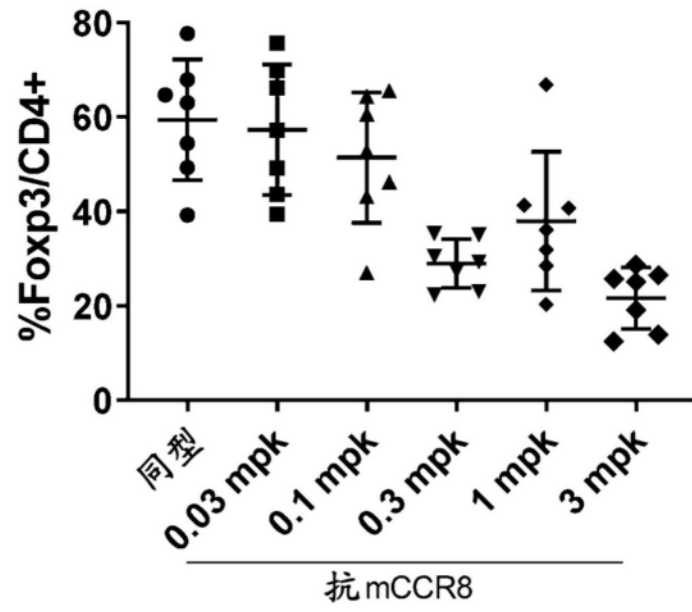


图24B

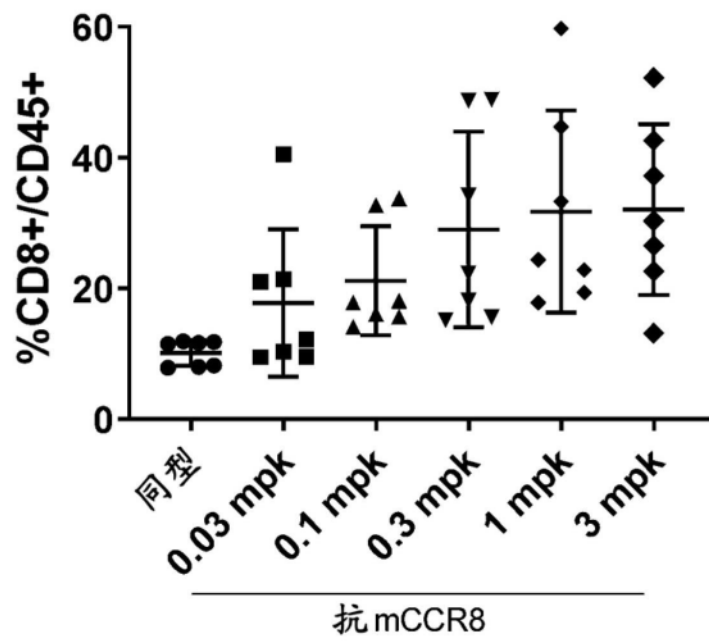


图24C

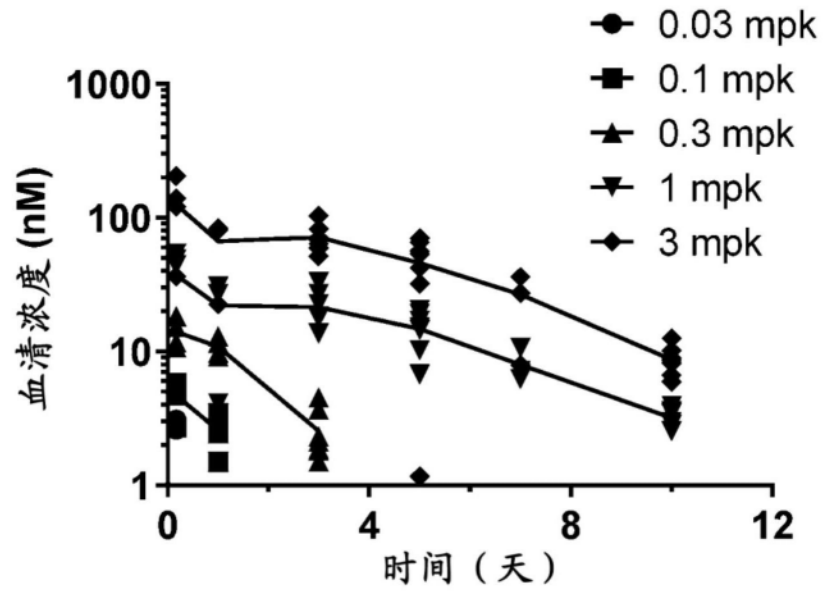


图24D

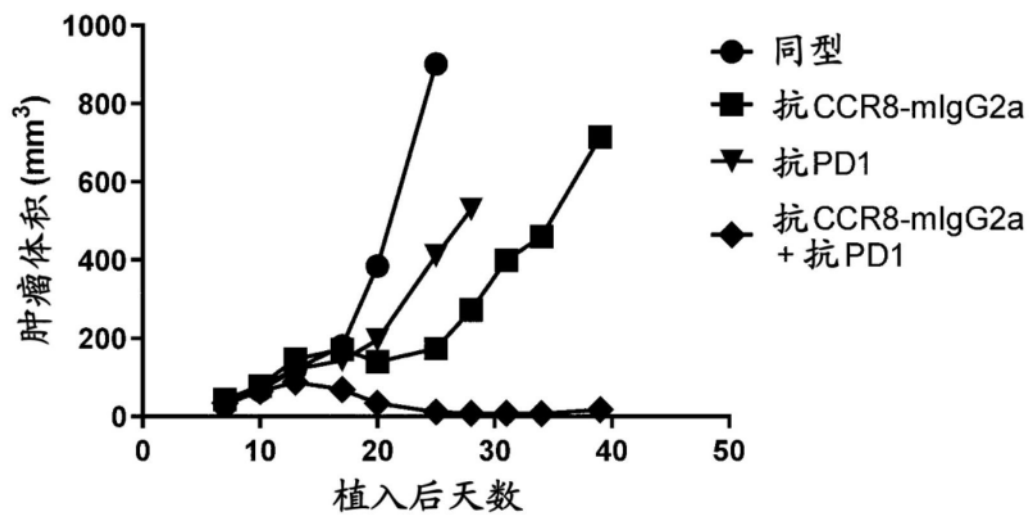


图25A

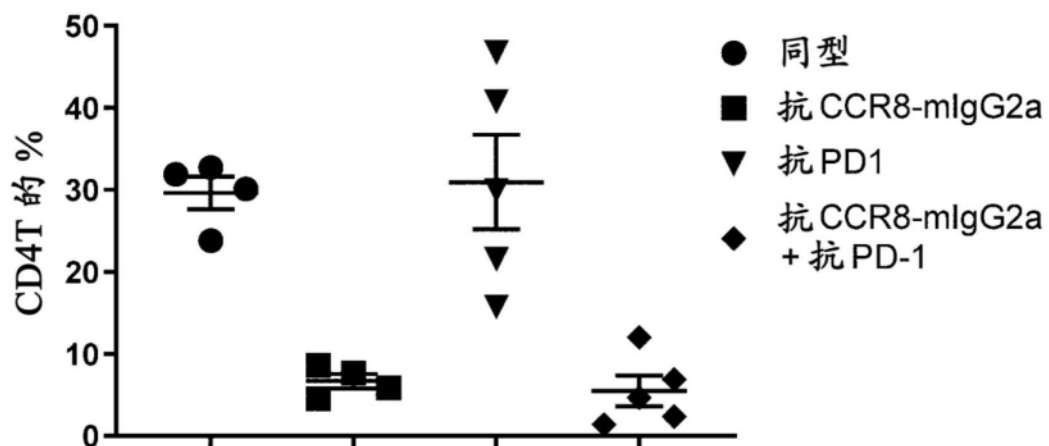


图25B

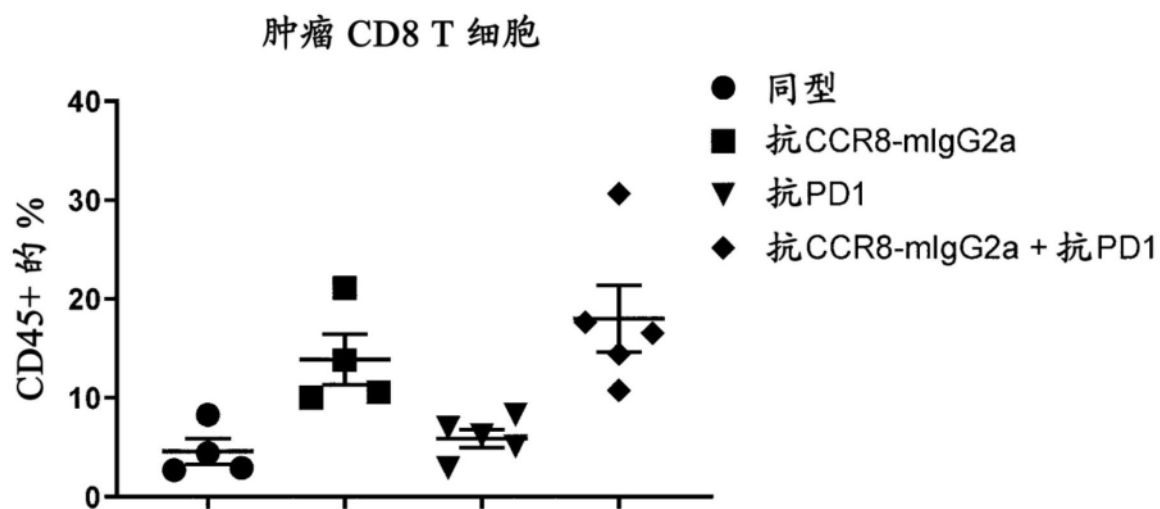


图25C

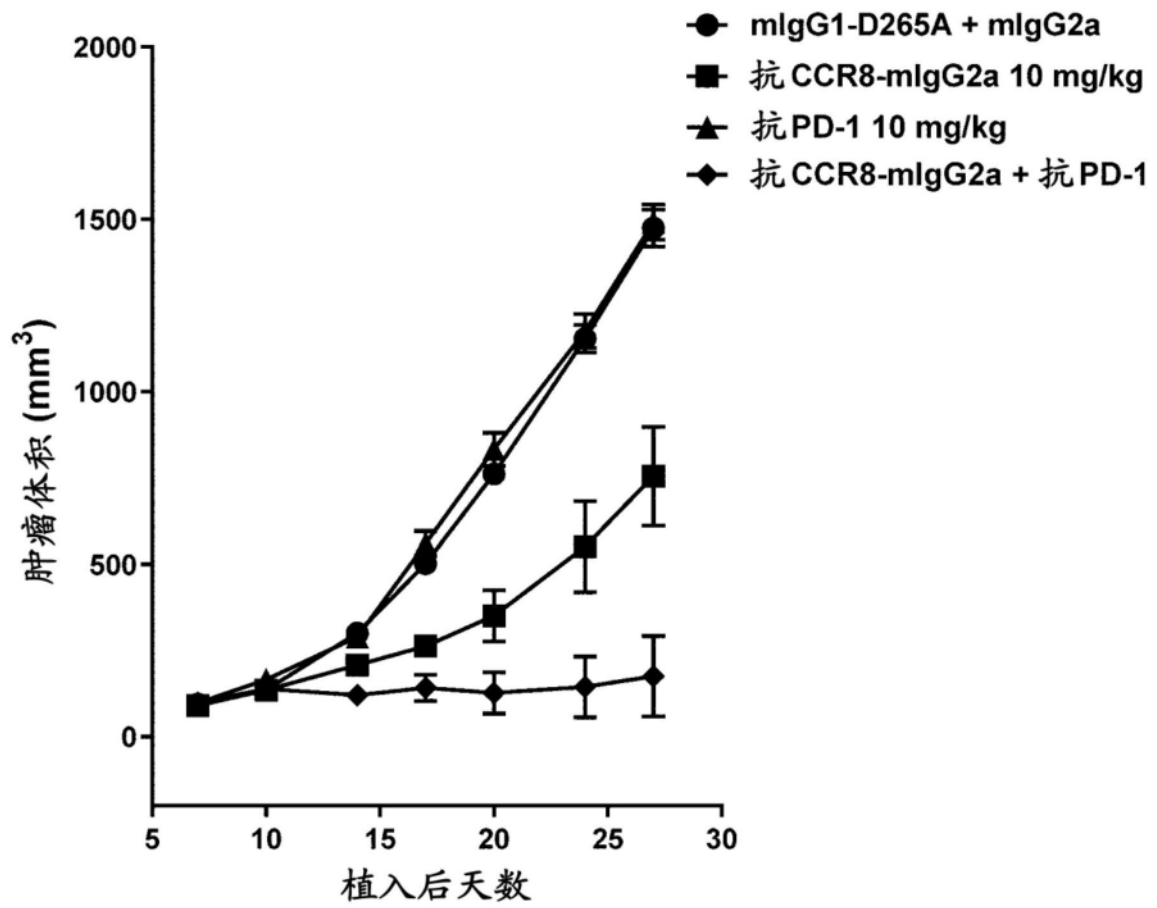


图26

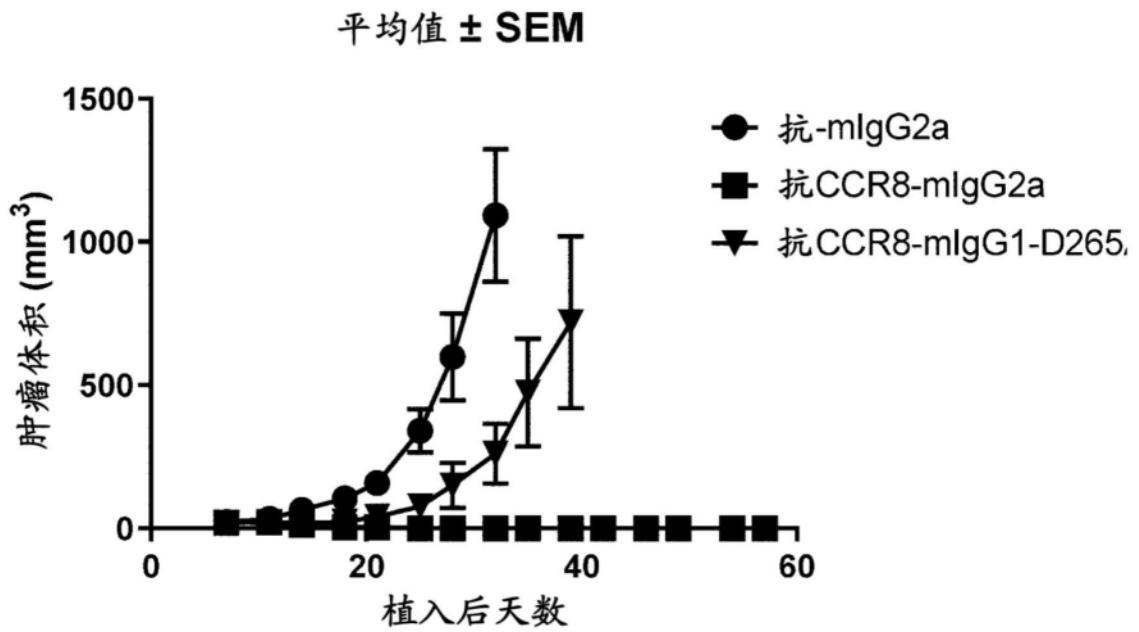


图27A

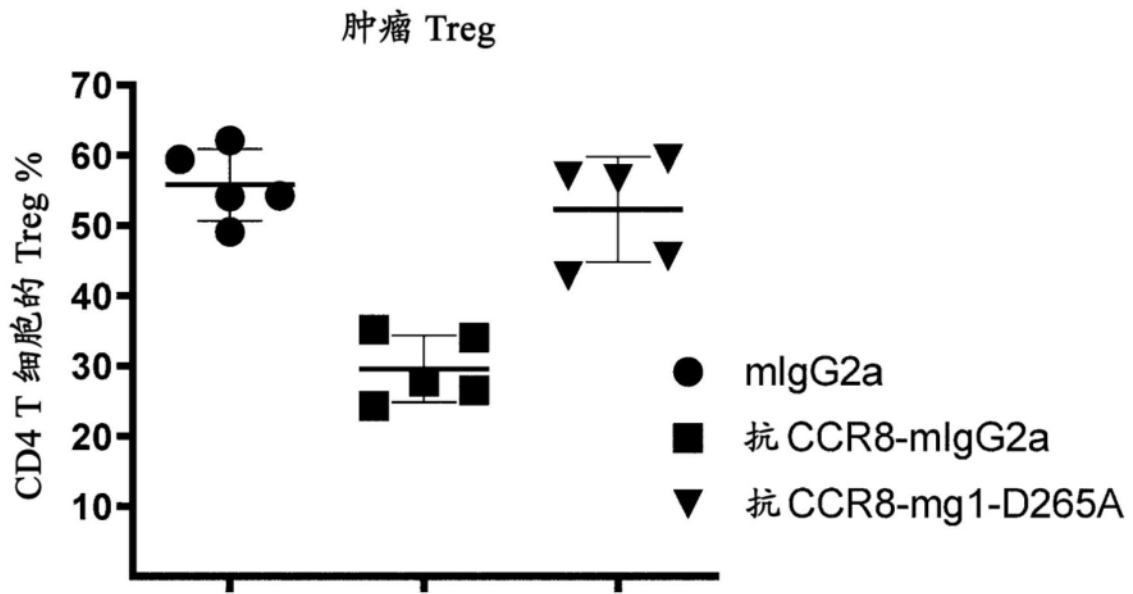


图27B

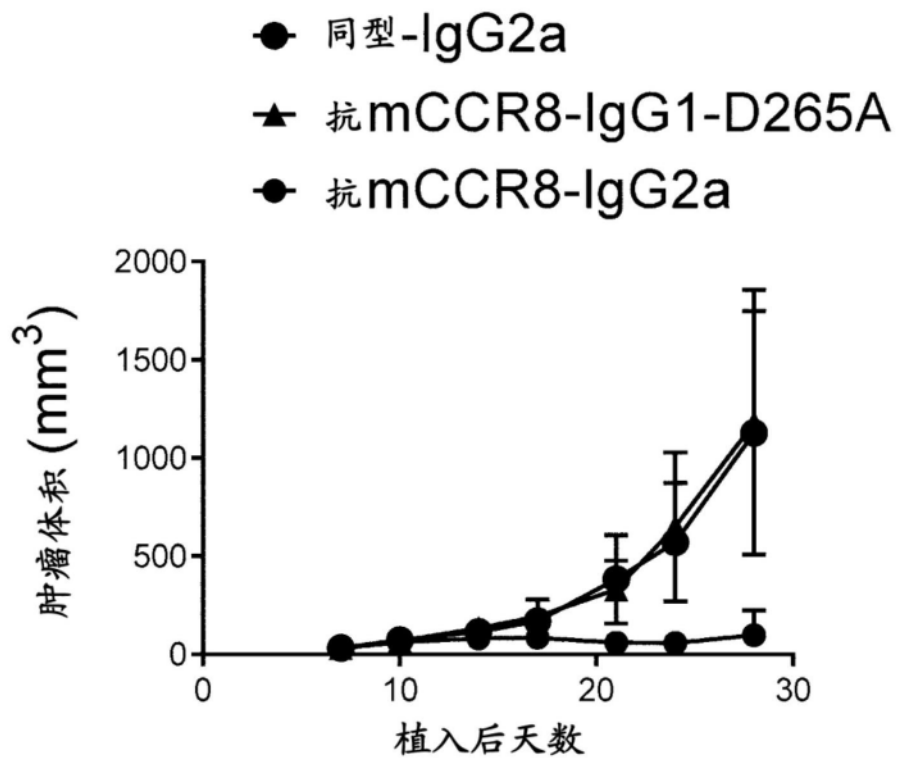


图28A

同型-IgG2a

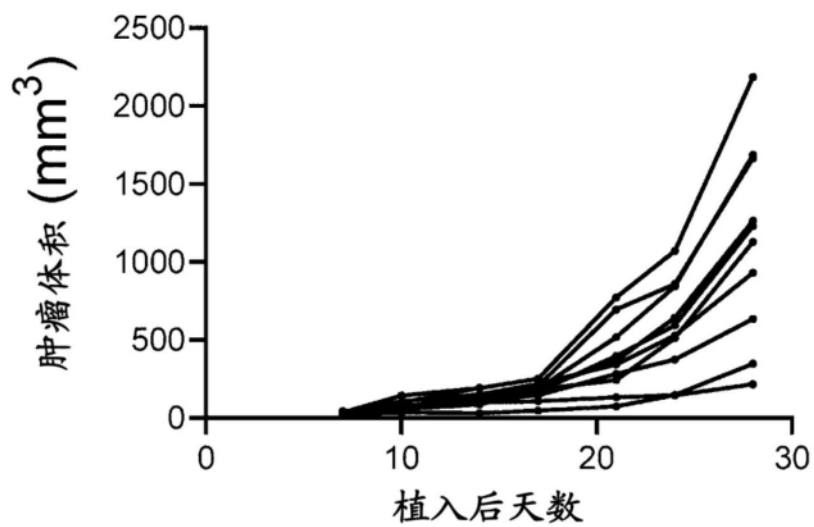


图28B

抗 mCCR8-IgG1-D265A

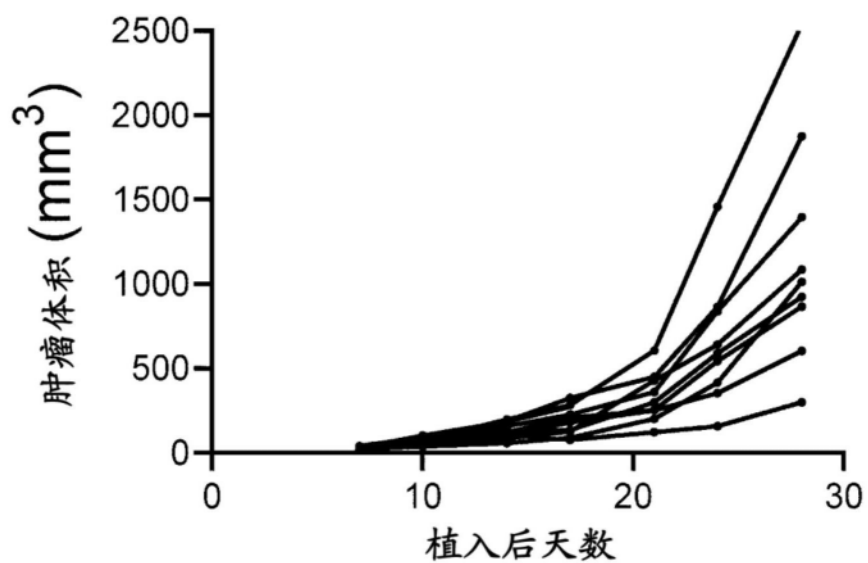


图28C

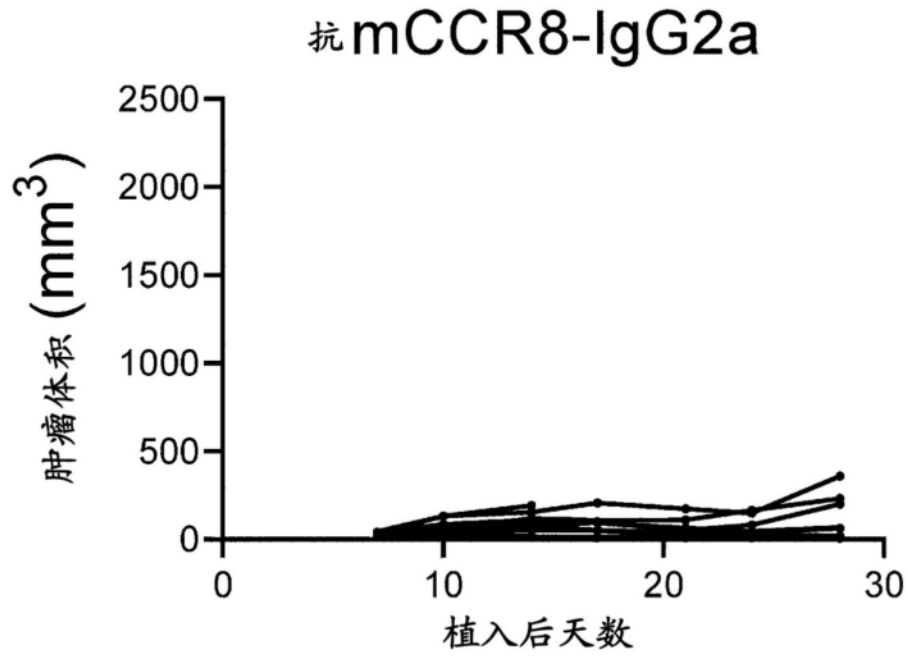


图28D

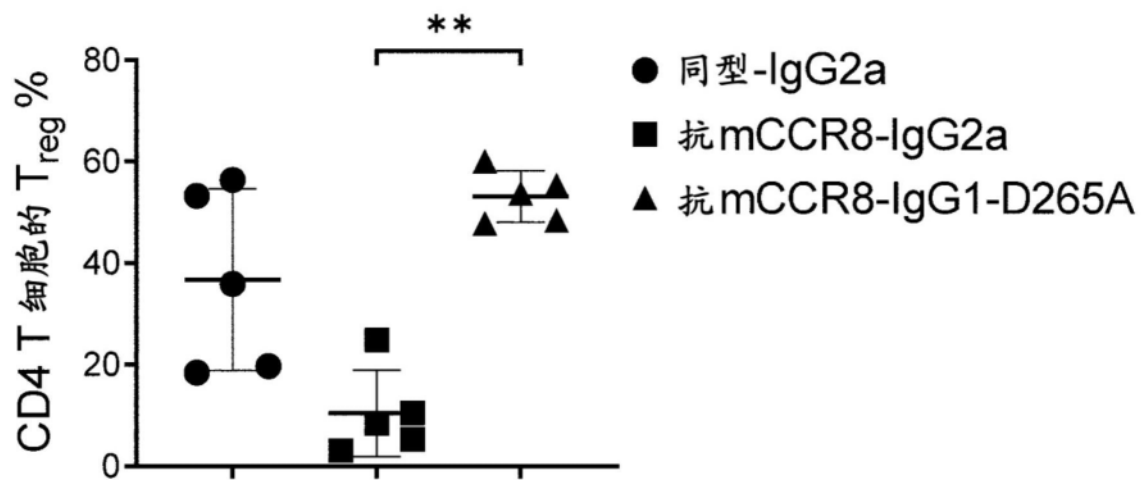


图28E

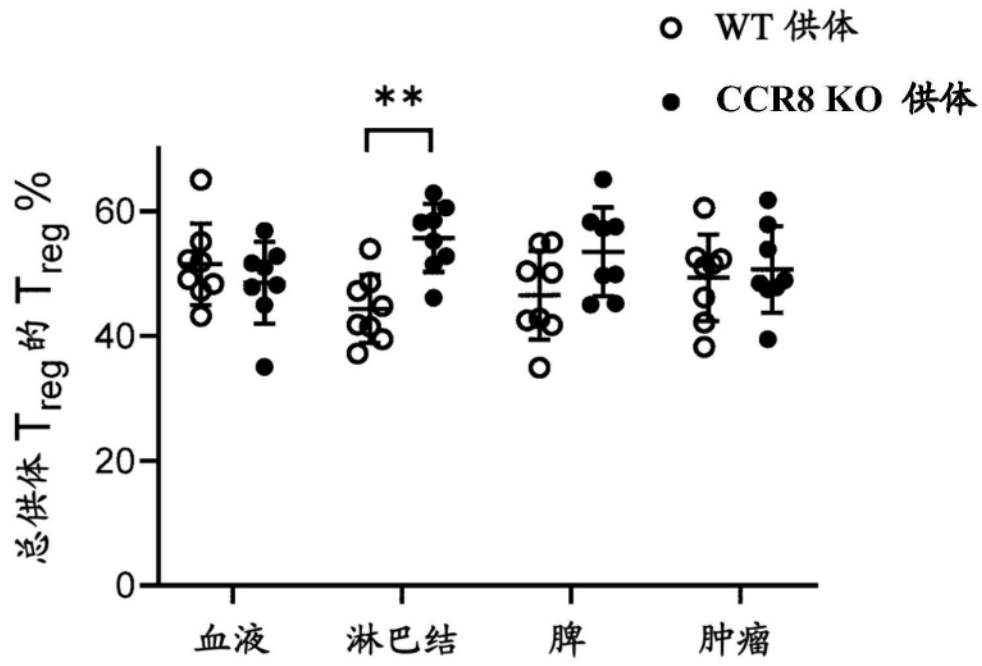


图28F

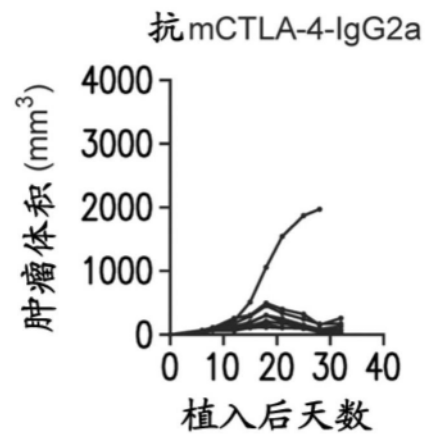


图29A

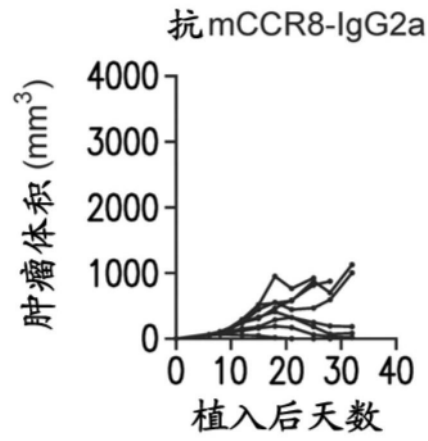


图29B

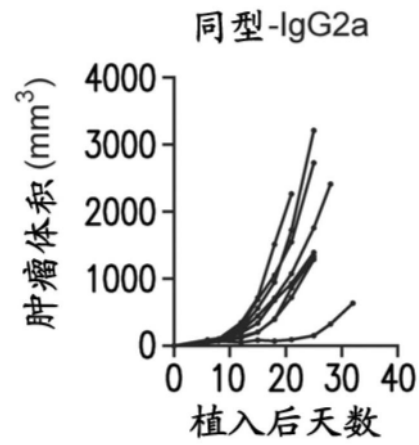


图29C

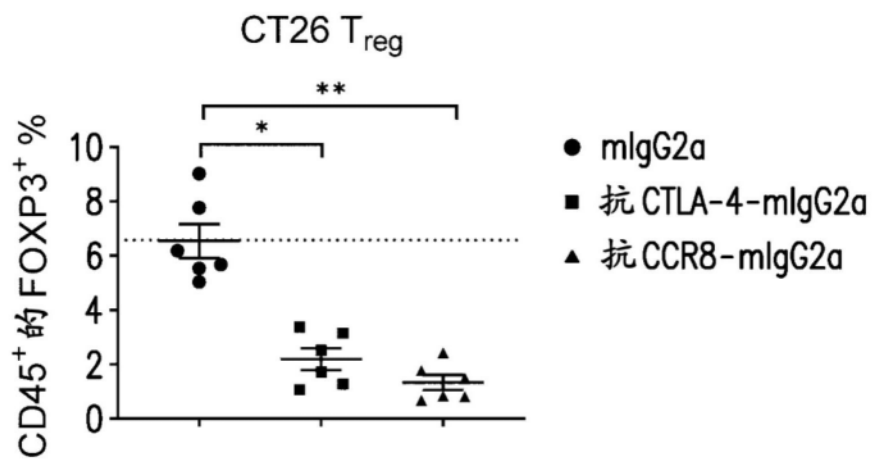


图29D

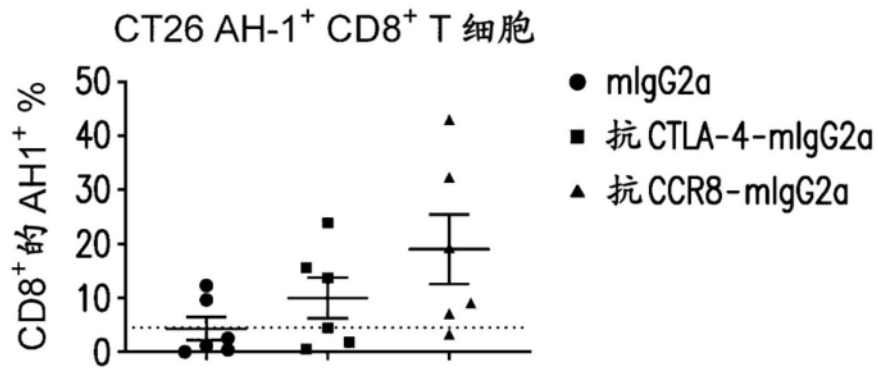


图29E

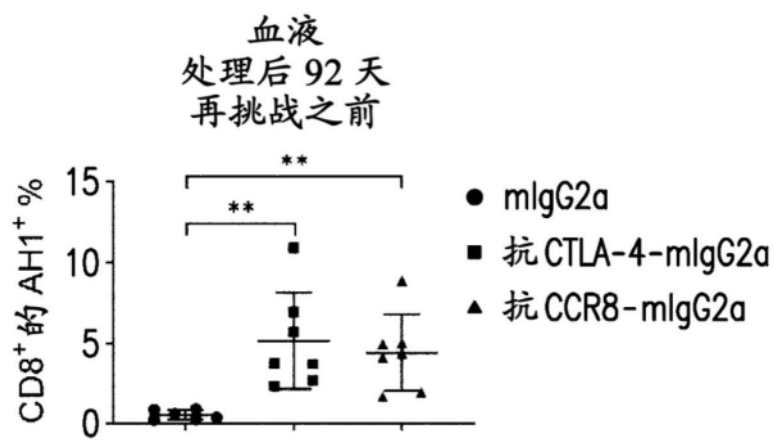


图29F

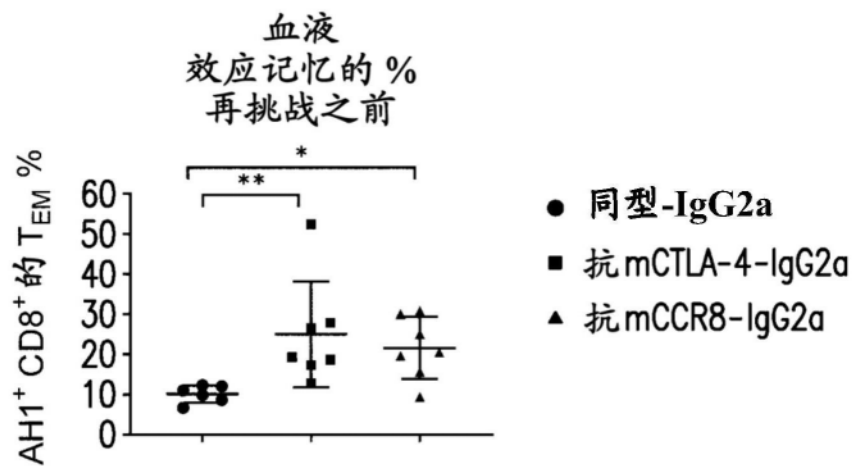


图29G

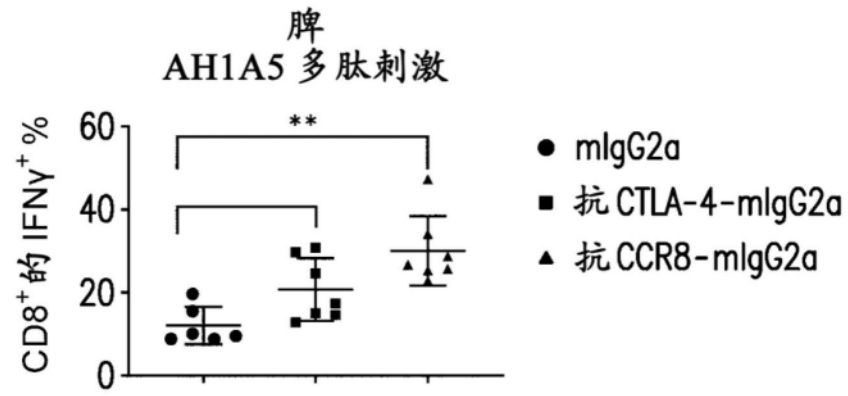


图29H

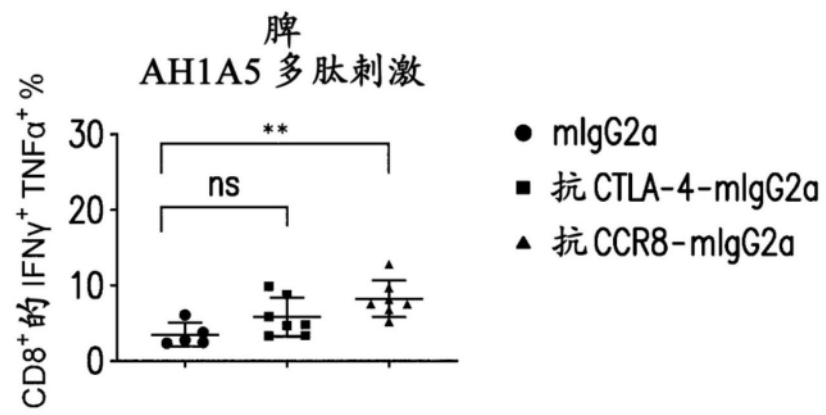


图29I

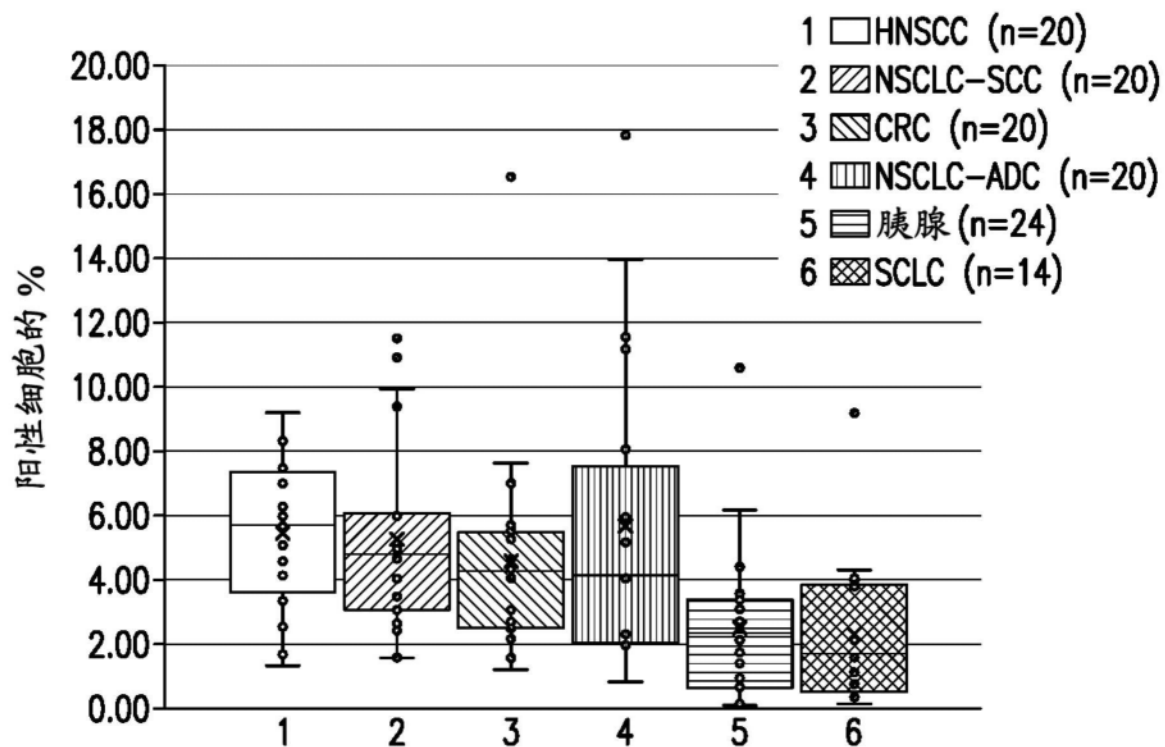


图30A

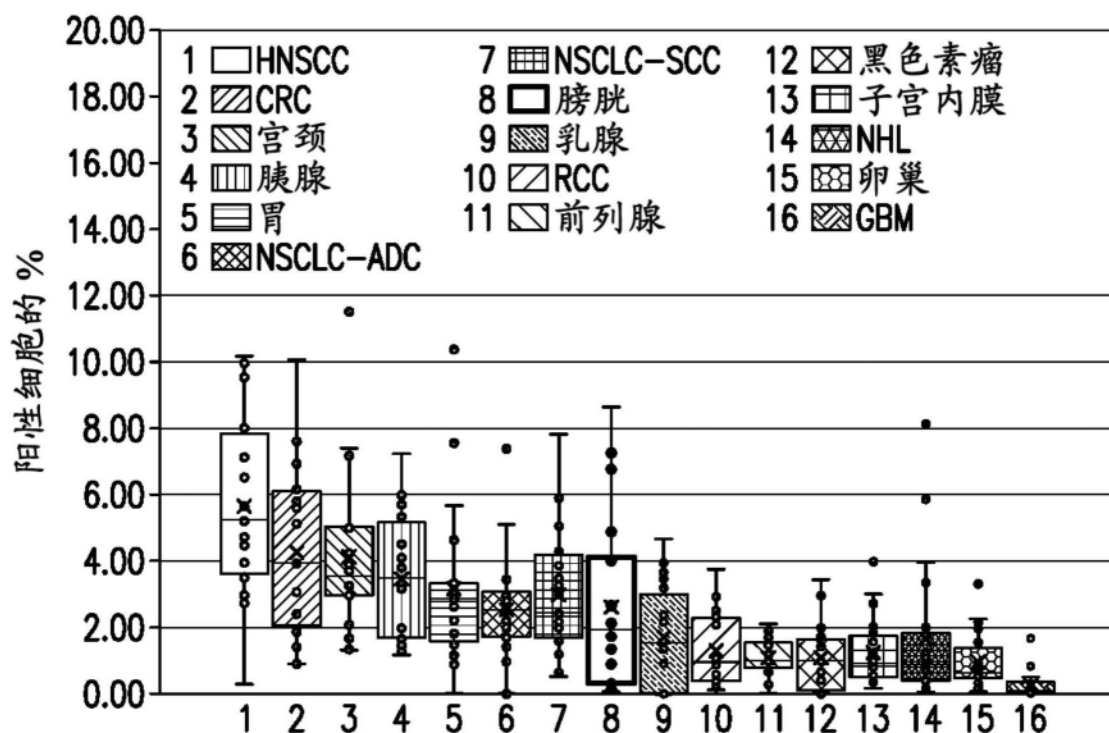


图30B