

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0157446

(43) 공개일자 2022년11월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2866 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7036358
- (22) 출원일자(국제) 2021년03월22일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년10월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/023430
- (87) 국제공개번호 WO 2021/194942
국제공개일자 2021년09월30일
- (30) 우선권주장
62/993,570 2020년03월23일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니
미국, 뉴저지 08543-4000, 프린스턴, 루트 206 앤드
드 프로빈스 라인 로드
- (72) 발명자
란, 루트 인-중
미국 94539 캘리포니아 프리몬트 스프링워터 드라이브 2300
아델라쿤, 올루페미 에이.
미국 08543 뉴저지 프린스턴 루트 206 앤드 프로
빈스 라인 로드 브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니
내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 39 항

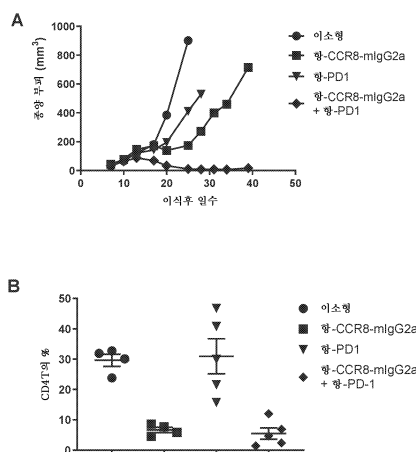
(54) 발명의 명칭 암을 치료하기 위한 항-CCR8 항체

(57) 요약

본 개시내용은 세포의 표면 상에 발현된 C-C 모티프 케모카인 수용체 8 (CCR8)에 특이적으로 결합하고 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)에 의해 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 단리된 항체, 예를 들어 모노클로날 항체를 제공한다. 본 개시내용은 암을 앓고 있는 대상체에게 치료 유효량의 항-CCR8 항체를 단독요법으로서 또는 항암제, 예컨대 면역 체크포인트 억제제, 예를 들어 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도25i

도 25A 및 25B



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

바르만, 이시타

미국 94030 캘리포니아 밀브레 파라마운트 드라이브 351

캠벨, 조셉 리처드

미국 94305 캘리포니아 스탠포드 움스테드 로드 28
넘버107

디옹, 에스제이 지안 제

미국 94063 캘리포니아 레드우드 시티 베이 로드
700 브리스톨-마이어드 스쿼드 컴퍼니 내

핀다이젠, 펠릭스

미국 94063 캘리포니아 레드우드 시티 베이 로드
700 브리스톨-마이어드 스쿼드 컴퍼니 내

그레나발트, 다니엘레 엠.

미국 08543 뉴저지 프린스턴 루트 206 앤드 프로빈
스 라인 로드 브리스톨-마이어드 스쿼드 컴퍼니 내

제인, 리뉴

미국 94062 캘리포니아 레드우드 시티 아치 스트리트 14

자타키아, 에이미 디.

미국 94063 캘리포니아 레드우드 시티 베이 로드
700 브리스톨-마이어드 스쿼드 컴퍼니 내

리, 존 케이.

미국 94502 캘리포니아 알라메다 라구나리아 레인
205

이, 피터 성 근

미국 94030 캘리포니아 밀브레 힐크레스트 볼러바
드 861

리양, 린다

미국 94043 캘리포니아 마운틴 뷰 아다 애비뉴 128
아파트먼트 8

루, 카이

미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 비치 파크 볼
러바드 910 아파트먼트 105

맥도널드, 브라이언

미국 92117 캘리포니아 샌디에고 컨스티튜션 로드
5142

메스코, 폴 블레인

미국 94063 캘리포니아 레드우드 시티 브래드포드
스트리트 655 아파트먼트 946

라즈팔, 아르빈드

미국 94127 캘리포니아주 샌프란시스코 그랜빌 웨
이 150

삼반타무르티, 샤르밀라

미국 94063 캘리포니아 레드우드 시티 베이 로드
700 브리스톨-마이어드 스쿼드 컴퍼니 내

셀비, 마크 제이.

미국 94131 캘리포니아 샌프란시스코 갈레우드 서
클 136

시머스, 네이션 오.

(30) 우선권주장

63/041,992 2020년06월21일 미국(US)
63/157,618 2021년03월05일 미국(US)

미국 93950 캘리포니아 퍼시픽 그로브 뷰포드 플레
이스 904

스트롭, 파벨

미국 94403 캘리포니아주 샌마테오 웨스트 25번 애
비뉴 461

테라시나, 가비 에이.

미국 08543 뉴저지 프린스턴 루트 206 앤드 프로빈
스 라인 로드 브리스톨-마이언스 스킵 컴퍼니 내

왕, 시-타오

미국 08543 뉴저지 프린스턴 루트 206 앤드 프로빈
스 라인 로드 브리스톨-마이언스 스킵 컴퍼니 내

명세서

청구범위

청구항 1

세포의 표면 상에 발현된 C-C 모티프 케모카인 수용체 8 (CCR8)에 특이적으로 결합하고 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)에 의해 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열이 서열식별번호: 1에 제시된 인간 CCR8 (hCCR8)에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 인간 IgG1 또는 IgG3 이소형의 중쇄 불변 영역을 포함하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분과 비교하여 Fc γ 수용체 (Fc γ R)에 보다 높은 친화도로 결합하고 증진된 ADCC를 매개하며, 임의로 적어도:

실시에 17에 기재된 NK 세포 용해 검정에서 세포 용해에 대한 EC₅₀의 감소에 의해 측정된 바와 같은

- (a) 2배 증진된 ADCC 활성;
- (b) 5배 증진된 ADCC 활성; 또는
- (c) 10배 증진된 ADCC 활성

을 매개하는 변형된 중쇄 불변 영역을 포함하는, 변형된 항-hCCR8 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 5

제4항에 있어서, 감소된 푸코실화를 나타내는 변형된 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함하고, 임의로 저푸코실화 또는 비푸코실화된 변형된 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함하는 변형된 항-hCCR8 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 증진된 ADCC를 매개하는 돌연변이 또는 다수의 돌연변이를 함유하는 변형된 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함하며, 임의로 여기서 돌연변이 또는 다수의 돌연변이는 G236A; S239D; F243L; E333A; G236A/I332E; S239D/I332E; S267E/H268F; S267E/S324T; H268F/S324T; G236A/S239D/I332E; S239D/A330L/I332E; S267E/H268F/S324T; 및 G236A/S239D/A330L/I332E로부터 선택된 것인 변형된 항-hCCR8 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

- (i) 실시에 11에 기재된 바와 같은 결합 검정에 의해 측정된 바와 같은 하기:
 - (a) 약 10 nM 이하;
 - (b) 약 5 nM 이하;
 - (c) 약 1.7 nM 이하;

- (d) 약 1 nM 이하;
- (e) 약 0.5 nM 이하;
- (f) 약 0.1 nM 이하;
- (g) 약 0.1 nM;
- (h) 약 1.7 nM;
- (i) 약 0.1 nM 내지 약 10 nM;
- (j) 약 0.1 nM 내지 약 2 nM;
- (k) 약 0.5 nM 내지 약 5 nM;
- (l) 약 1 nM 내지 약 2 nM; 또는
- (m) 약 0.5 nM 내지 약 1 nM

의 EC₅₀으로 인간 CCR8-발현 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포에 특이적으로 결합하고/거나;

(ii) 실시예 11에 기재된 바와 같은 결합 검정에 의해 측정된 바와 같은 하기:

- (a) 약 50 nM 이하;
- (b) 약 14 nM 이하;
- (c) 약 5 nM 이하;
- (d) 약 2 nM 이하;
- (e) 약 0.5 nM 이하;
- (f) 약 0.3 nM 이하;
- (g) 약 0.1 nM 이하;
- (h) 약 0.03 nM 이하;
- (i) 약 1.7 nM;
- (j) 약 0.03 nM 내지 약 10 nM;
- (k) 약 0.1 nM 내지 약 5 nM; 또는
- (l) 약 0.2 nM 내지 약 2 nM

의 EC₅₀으로 활성화된 조절 T 세포 (Treg)에 특이적으로 결합하고/거나;

(iii) 실시예 11에 기재된 바와 같이 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 측정된 바와 같은 하기:

- (a) 약 100 nM 이하;
- (b) 약 50 nM 이하;
- (c) 약 10 nM 이하;
- (d) 약 5 nM 이하;
- (e) 약 1.6 nM;
- (f) 약 1.0 nM 이하;
- (g) 약 0.5 nM 이하;
- (h) 약 0.1 nM 이하;
- (i) 약 100 nM 내지 약 0.1 nM;

(j) 약 50 nM 내지 약 0.5 nM;

(k) 약 10 nM 내지 약 1 nM; 또는

(l) 약 2 nM 내지 약 1 nM

의 K_D 로 황산화 티로신-15 및 티로신-17 잔기를 포함하는 인간 CCR8의 N-말단 펩티드에 결합하고/거나;

(iv) 실시예 11에 기재된 바와 같이 SPR에 의해 측정된 바와 같은 하기:

(a) 약 100 nM 이하;

(b) 약 50 nM 이하;

(c) 약 25 nM 이하;

(d) 약 10 nM 이하;

(f) 약 1.0 nM 이하;

(e) 약 20 nM;

(i) 약 100 nM 내지 약 1 nM;

(j) 약 50 nM 내지 약 10 nM; 또는

(k) 약 30 nM 내지 약 20 nM

의 K_D 로 단일 황산화 잔기, 티로신-15를 포함하는 인간 CCR8의 N-말단 펩티드에 결합하는,

모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 홍선의 수질 및 피부의 진피에서 회귀하고 산란된 면역 세포에 특이적으로 결합하지만, 인간 대뇌, 소뇌, 심장, 간, 폐, 신장, 편도, 비장, 흉선, 결장, 위, 췌장, 부신, 뇌하수체, 피부, 말초 신경, 고환 또는 자궁 조직, 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에는 결합하지 않는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 실시예 15에 기재된 바와 같은 칼슘 유동의 억제에 의해 측정된 바와 같이 추가로 CCR8에 대한 C-C 모티프 케모카인 리간드 1 (CCL1)의 결합을 억제하고, CCR8/CCL1 신호전달을 억제하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 하기:

(a) 약 10 nM 이하;

(b) 약 5 nM 이하;

(c) 약 1 nM 이하;

(d) 약 0.5 nM 이하;

(e) 약 0.1 nM 이하;

(f) 약 0.01 nM 이하;

(g) 약 0.01 nM 내지 약 10 nM;

(h) 약 0.05 nM 내지 약 5 nM;

(i) 약 0.1 nM 내지 약 1 nM; 또는

(j) 약 0.46 nM

의 IC₅₀으로 CCR8/CCL1 신호전달을 억제하고/거나;

(ii) 실시예 17에 기재된 바와 같은 CD16 가교 검정에 의해 측정된 바와 같은 하기:

(a) 약 100 pM 이하;

(b) 약 30 pM 이하;

(c) 약 10 pM 이하;

(d) 약 3 pM 이하;

(e) 약 1 pM 이하;

(e) 약 0.5 pM 이하;

(f) 약 0.1 pM 이하;

(g) 약 0.05 pM 이하;

(h) 약 0.7 pM;

(i) 약 0.05 pM 내지 약 50 pM;

(j) 약 0.1 pM 내지 약 10 nM;

(k) 약 0.3 nM 내지 약 7 nM; 또는

(l) 약 0.6 nM 내지 약 3 nM

의 EC₅₀으로 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하고/거나;

(iii) 실시예 19에 기재된 바와 같은 아포토시스 검정에 의해 측정된 바와 같은 하기:

(a) 약 500 pM 이하;

(b) 약 100 pM 이하;

(c) 약 30 pM 이하;

(d) 약 15 pM 이하;

(e) 약 5 pM 이하;

(f) 약 1 pM 이하;

(g) 약 13 pM;

(h) 약 1 pM 내지 약 500 pM;

(i) 약 5 pM 내지 약 100 pM; 또는

(j) 약 10 pM 내지 약 50 pM

의 EC₅₀으로 활성화된 Treg의 고갈을 매개하는,

모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, X선 결정학에 의해 결정된 바와 같이 인간 CCR8의 N-말단 도메인에 위치한 에피토프에 결합하며, 여기서 에피토프는 서열 V₁₂T₁₃D₁₄Y₁₅Y₁₆Y₁₇P₁₈D₁₉I₂₀F₂₁S₂₂ (서열식별번호: 109)를 갖는 펩티드 내의 적어도 1개의 아미노산을 포함하고, 임의로 여기서

(i) 에피토프는 서열 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (서열식별번호: 109)를 갖는 펩티드 내의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 모든 아미노산을 포함하고; 임의로 여기서

(ii) 에피토프는 서열 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (서열식별번호: 109)를 갖는 펩티드 내의 모든 11개의 아미노산을 포함하고; 임의로 여기서

(iii) 아미노산 Y_{15} 및 Y_{17} 둘 다는 황산화된 것인

모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 12

ADCC를 매개할 수 있고, 서열이 서열식별번호: 1로 제시된 인간 C-C 모티프 케모카인 수용체 8 (hCCR8) 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분이며, 여기서 에피토프는 X선 결정학에 의해 결정된 바와 같이 hCCR8의 N-말단 도메인에 대략 아미노산 잔기 12 내지 22 ($V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$; 서열식별번호: 109)에 걸쳐 있는 펩티드 내에 위치하고, 임의로 여기서

(i) 에피토프는 서열 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (서열식별번호: 109)를 갖는 펩티드 내의 적어도 1개의 아미노산을 포함하거나;

(ii) 에피토프는 서열 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (서열식별번호: 109)를 갖는 펩티드 내의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 모든 아미노산을 포함하거나;

(iii) 에피토프는 서열 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (서열식별번호: 109)를 갖는 펩티드 내의 11개의 아미노산을 포함하거나; 또는

(iv) 에피토프는 서열 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (서열식별번호: 109)를 갖는 펩티드 내의 모든 11개의 아미노산으로 이루어진 것인

모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 항체 또는 그의 부분은, 세포의 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때, 가교 항체의 존재 또는 부재 하에 CCR8의 내재화를 유발하지 않고/거나;

(ii) 항체 또는 그의 부분은 시험관내에서 인간 종양-연관 Treg의 고갈을 촉진하고/거나;

(iii) 항체 또는 그의 부분은 비-종양 조직에서 $CCR8^+$ T 세포를 고갈시키지 않으면서 종양 Treg의 고갈을 특이적으로 유도하며, 임의로 여기서 비-종양 조직은 피부, 흉선, 비장 또는 혈액이고/거나;

(iv) 항체 또는 그의 부분은 대상체에게 단독요법으로서 투여되는 경우에 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하고/거나;

(v) 항체 또는 그의 부분은 암을 치료하기 위한 추가의 치료제와 조합하여 대상체에게 투여되는 경우에 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 것인

모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 특성:

(a) 세포의 표면 상에 발현된 CCR8에 약 2 nM 이하의 EC_{50} 으로 특이적으로 결합함;

(b) 흉선의 수질 및 피부의 진피에서 회귀하고 산란된 면역 세포에 특이적으로 결합하지만, 인간 대뇌, 소뇌, 심장, 간, 폐, 신장, 편도, 비장, 흉선, 결장, 위, 췌장, 부신, 뇌하수체, 피부, 말초 신경, 고환 또는 자궁 조

직, 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에는 결합하지 않음;

(c) CCR8에 대한 CCL1의 결합을 억제하고, CCR8/CCL1 신호전달을 약 5 nM 이하의 IC_{50} 으로 억제함;

(d) 세포의 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때 약 10 pM 이하의 EC_{50} 으로 세포의 고갈을 매개함;

(e) 세포의 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때 가교 항체의 존재 또는 부재 하에 CCR8의 내재화를 유발하지 않음;

(f) 실시예 22에 기재된 검정을 사용하여 시험관내에서 인간 종양-연관 Treg의 고갈을 촉진함;

(g) 실시예 20에 기재된 검정을 사용하여 생체의 인간 종양 슬라이스 샘플에서 인간 종양-연관 Treg의 고갈을 촉진함;

(h) 비-종양 조직에서 CCR8⁺ T 세포를 보존하면서 특이적으로 종양 Treg의 고갈을 매개함;

(i) 대상체에게 단독요법으로서 투여되는 경우에 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제함; 및

(j) 대상체에게 암을 치료하기 위한 추가의 치료제와 조합하여 투여되는 경우에 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제함

중 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개를 나타내며, 임의로 여기서 이들 특성 모두를 나타내는 것인 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 15

제34항 또는 제35항에 있어서, 인간 CCR8의 N-말단 도메인에 위치한 에피토프에 약 10 nM 이하의 K_D 로 추가로 결합하며, 여기서 에피토프는 서열 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (서열식별번호: 109) 및 황산화 티로신-15 및 티로신-17 잔기를 갖는 펩티드를 포함하는 것인 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 16

제14항 또는 제15항의 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분과 비교하여 $Fc\gamma$ 수용체 ($Fc\gamma R$)에 보다 높은 친화도로 결합하고 적어도 2, 5 또는 10배 증진된 ADCC를 매개하는 변형된 중쇄 불변 영역을 포함하는 변형된 항-hCCR8 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 참조 항체가 결합하는 것과 동일한 에피토프에 결합하며, 여기서 참조 항체는:

(a) 서열식별번호: 3으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 15로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(b) 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(c) 서열식별번호: 5로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 17로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(d) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(e) 서열식별번호: 7로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 19로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(f) 서열식별번호: 8로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 20으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

- (g) 서열식별번호: 9로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 21로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (h) 서열식별번호: 10으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 22로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (i) 서열식별번호: 11로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 23으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (j) 서열식별번호: 12로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 24로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (k) 서열식별번호: 13으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 25로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (l) 서열식별번호: 14로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 26으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ; 또는
- (m) 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L
- 을 포함하는 것인 모노클로날 항체 또는 항원-결합 부분.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, hCCR8에의 결합에 대해 참조 항체와 교차-경쟁하며, 여기서 참조 항체는:

- (a) 서열식별번호: 3으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 15로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (b) 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (c) 서열식별번호: 5로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 17로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (d) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (e) 서열식별번호: 7로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 19로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (f) 서열식별번호: 8로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 20으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (g) 서열식별번호: 9로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 21로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (h) 서열식별번호: 10으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 22로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

- (i) 서열식별번호: 11로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 23으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
 - (j) 서열식별번호: 12로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 24로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
 - (k) 서열식별번호: 13으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 25로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
 - (l) 서열식별번호: 14로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 26으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ; 또는
 - (m) 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L
- 을 포함하는 것인 모노클로날 항체 또는 항원-결합 부분.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 하기:

- (a) 서열식별번호: 3으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 15로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (b) 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (c) 서열식별번호: 5로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 17로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (d) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (e) 서열식별번호: 7로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 19로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (f) 서열식별번호: 8로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 20으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (g) 서열식별번호: 9로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 21로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (h) 서열식별번호: 10으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 22로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (i) 서열식별번호: 11로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 23으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (j) 서열식별번호: 12로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 24로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- (k) 서열식별번호: 13으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 25

로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(l) 서열식별번호: 14로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 26으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ; 또는

(m) 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L

각각의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 20

제19항에 있어서, 카바트 방법에 의해 정의된 바와 같은 하기 CDR 도메인:

(a) 서열식별번호: 27로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 28로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 29로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 30으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 31로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 32로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;

(b) 서열식별번호: 33으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 34로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 35로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 36으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 37로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 38로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;

(c) 서열식별번호: 39로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 40으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 41로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 42로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 43으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 44로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;

(d) 서열식별번호: 45로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 46으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 47로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 48로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 49로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 50으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;

(e) 서열식별번호: 51로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 52로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 53으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 54로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 55로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 56으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;

(f) 서열식별번호: 57로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 58로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 59로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 60으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 61로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 62로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;

로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(b) 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(c) 서열식별번호: 5로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 17로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(d) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(e) 서열식별번호: 7로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 19로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(f) 서열식별번호: 8로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 20으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(g) 서열식별번호: 9로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 21로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(h) 서열식별번호: 10으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 22로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(i) 서열식별번호: 11로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 23으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(j) 서열식별번호: 12로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 24로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(k) 서열식별번호: 13으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 25로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

(l) 서열식별번호: 14로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 26으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ; 또는

(m) 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L

을 포함하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서,

(a) 서열식별번호: 99로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 111로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄;

(b) 서열식별번호: 100으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 112로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄;

(c) 서열식별번호: 101로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 113으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄;

(d) 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호:

114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄;

(e) 서열식별번호: 117로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 118로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄; 또는

(f) 서열식별번호: 110으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 119로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄

를 포함하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체 또는 그의 단편인 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 24

세포용해제에 연결된, 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 면역접합체이며, 임의로 여기서 세포용해제는 세포독소 또는 방사성 동위원소인 면역접합체.

청구항 25

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합 부분과는 상이한 결합 특이성을 갖는 결합 도메인에 연결된, 상기 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 이중특이적 분자.

청구항 26

(a) 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분;

(b) 제24항의 면역접합체; 또는

(c) 제25항의 이중특이적 분자,

및 제약상 허용되는 담체

를 포함하는 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 28

제27항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 29

제28항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 30

항-CCR8 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 제29항의 숙주 세포에서 발현시키고, 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 숙주 세포로부터 단리하는 것을 포함하는, 항-CCR8 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 제조하는 방법.

청구항 31

암을 앓고 있는 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 제24항의 면역접합체, 제25항의 이중특이적 분자 또는 제26항의 제약 조성물을 투여하여 대상체가 치료되도록 하는 것을 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법.

청구항 32

대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 제24항의 면역접합체, 제25항의 이중특이적 분자 또는 제26항의 제약 조성물을 투여하여 대상체에서 종양 세포의

성장이 억제되도록 하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 대상체에게 암을 치료하기 위한 치료 유효량의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하며, 임의로 여기서 추가의 치료제는 면역계의 억제를 감소시키거나 또는 자극을 증가시키는 화합물인 방법.

청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 35

제31항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 암은 고형 종양이고, 임의로 고형 종양은

(i) 편평 세포 암종, 소세포 폐암 (SCLC), 비소세포 폐암 (NSCLC), 편평 NSCLC, 비-편평 NSCLC, 두경부암, 유방암, 식도암, 위암, 위장암, 소장암, 간암, 간세포성 암종 (HCC), 췌장암 (PAC), 신장암, 신세포 암종 (RCC), 방광암, 요도암, 요관암, 결장직장암 (CRC), 결장암, 결장 암종, 항문부암, 자궁내막암, 전립선암, 섬유육종, 신경모세포종, 신경교종, 교모세포종, 배세포 종양, 소아 육종, 부비동비강 자연 킬러, 흑색종, 피부암, 골암, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막 암종, 난관 암종, 난소암, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 고환암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연부 조직 육종, 음경암, 신우 암종, 중추 신경계 (CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척수축 종양, 뇌암, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피양암, 편평 세포암, 소아기 고형 종양, 환경적으로 유발된 암, 바이러스-관련 암, 바이러스 기원의 암, 진행성 암, 절제불가능한 암, 전이성 암, 불응성 암, 재발성 암 및 그의 임의의 조합으로부터 선택된 암; 또는

(ii) 비소세포 폐암 (NSCLC), 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN), 결장직장암 (CRC), 위암, 위식도 (GE) 접합부암 및 자궁경부암으로부터 선택된 암; 또는

(iii) 두경부 편평 세포 암종 (HNSC), 폐 선암종 (LUAD), 위 선암종 (STAD), 폐 편평 세포 암종 (LUSC), 췌장 선암종 (PAAD), 직장 선암종 (READ), 식도 암종 (ESCA), 유방 침습성 암종 (BRCA), 결장 선암종 (COAD) 및 자궁경부 편평 세포 암종 및 자궁경내막 선암종 (CESC)으로부터 선택된 암; 또는

(iv) 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN), 자궁경부암, 결장직장암 (CRC), 비소세포 폐암-편평 세포 암종 (NSCLC-SCC), NSCLC-선암종 (NSCLC-ADC), 췌장암, 위암, 방광암 및 유방암으로부터 선택된 암; 또는

(v) 결장 선암종, 방광 암종, 유방 암종 및 섬유육종으로부터 선택된 암이거나; 또는

(b) 암은 혈액 악성종양이거나 또는 종양 세포가 혈액 악성종양의 세포이고, 임의로 여기서 혈액 악성종양은 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 급성 골수 백혈병 (AML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 만성 골수 백혈병 (CML), T 세포 림프종, 호지킨 림프종 (HL), 비-호지킨 림프종 (NHL), 다발성 골수종, 무증상 골수종, 의미 불명의 모노클로날 감마글로불린병증 (MGUS), 진행성, 전이성, 불응성 및/또는 재발성 혈액 악성종양, 및 상기 혈액 악성종양의 임의의 조합으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 36

제31항에 있어서, 추가의 치료제가

(a) 프로그램화된 사멸-1 (PD-1), 프로그램화된 사멸 리간드-1 (PD-L1), 세포독성 T-림프구 항원-4 (CTLA-4), 림프구 활성화 유전자-3 (LAG-3), B 및 T 림프구 감쇠자 (BTLA), T 세포 이뮤노글로불린 및 뮤신 도메인-3 (TIM-3), 킬러 이뮤노글로불린-유사 수용체 (KIR), 킬러 세포 력틴-유사 수용체 G1 (KLRG-1), 아데노신 A2a 수용체 (A2aR), Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT), T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제자 (VISTA), 원종양유전자 티로신-단백질 키나제 MER (MerTK), 자연 킬러 세포 수용체 2B4 (CD244) 또는 CD160에 특이적으로 결합하는 길항제; 또는

(b) 유도성 T 세포 공동-자극제 (ICOS), CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), CD27, 글루코코르티코이드-유도된 TNFR-관련 단백질 (GITR), 또는 헤르페스바이러스 진입 매개체 (HVEM)에 특이적으로 결합하는 효능제이고; 임의

로 여기서:

(i) PD-1에 특이적으로 결합하는 길항제는 니블루맙, 펌브롤리주맙, 세미폴리맙, 스파르탈리주맙, 캄렐리주맙, 신틸리맙, 티슬렐리주맙 및 토리팔리맙으로부터 선택되거나; 또는

(ii) PD-L1에 특이적으로 결합하는 길항제는 아테졸리주맙, 두르발루맙, 아벨루맙, 엔바폴리맙, BMS-936559, CK-301, CS-1001, SHR-1316, CBT-502 및 BGB-A333으로부터 선택되거나; 또는

(iii) CTLA-4에 특이적으로 결합하는 길항제는 이필리무맙 또는 트레멜리무맙인

방법.

청구항 37

암을 앓고 있는 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 제24항의 면역접합체, 제25항의 이중특이적 분자, 또는 제26항의 제약 조성물을 투여하여, 대상체가 치료제 단독에 의해 도출된 면역 반응과 비교하여 암에 대해 더 강한 면역 반응을 경험하도록 하는 것을 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체에서 치료제에 의해 도출된 항종양 면역 반응을 강화시키는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 치료제가 면역 체크포인트 억제제 또는 방사선요법이며, 임의로 여기서 체크포인트 억제제는 항-PD-1, 항-PD-L1 또는 항-CTLA-4 항체인 방법.

청구항 39

(a) C-C 모티프 케모카인 수용체 8 (CCR8)에 특이적으로 결합하고 ADCC에 의한 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분 약 0.01 내지 약 20 mg/kg 체중 범위의 하나 이상의 투여량;

(b) 임의로, PD-1, PD-L1 또는 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분 약 200 내지 약 1600 mg 범위의 하나 이상의 투여량; 및

(c) 제31항 내지 제36항 중 어느 한 항의 방법에서 CCR8에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 부분, 및 임의로 PD-1, PD-L1 또는 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 부분을 사용하는 것에 대한 지침서

를 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체를 치료하기 위한 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원 전체에 걸쳐, 다양한 간행물들이 괄호 내의 저자 명 및 날짜, 또는 특허 번호 또는 특허 공개 번호로써 인용된다. 이러한 간행물에 대한 전체 인용은 청구범위 바로 앞에 명세서 말미에서 찾을 수 있다. 이들 공보물의 개시내용은 본원에 기재되고 청구된 본 발명의 시점을 기준으로 본원 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 바와 같은 최신 기술을 더 충분히 설명하기 위해 그들의 전문이 본 출원에 참조로 포함된다. 그러나, 이들 개시내용은, 참조로 포함된 정보와 본 출원에서 명시적 개시내용에 의해 제공된 정보 사이에 충돌이 존재하지 않는 정도로만 본 출원에 포함된다. 더욱이, 본원에서 참고문헌의 인용은 이러한 참고문헌이 본 발명에 대한 선행 기술이라는 것을 인정하는 것으로서 간주되지 않아야 한다.

[0002] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0003] 본 출원은 미국 가출원 번호 63/157,618 (2021년 3월 5일 출원); 63/041,992 (2020년 6월 21일 출원); 및 62/993,570 (2020년 3월 23일 출원)의 이익을 주장하며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0004] 서열 목록

[0005] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자 제출된 서열 목록을 포함하며, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. ASCII 카피는 2021년 3월 19일에 생성되었고, 20210319_SEQ13358WOPCT.txt로 명명되고, 81,920 바이트 크기이다.

[0006]

발명의 분야

[0007]

개시된 발명은 C-C 모티프 케모카인 수용체 8 (CCR8)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 (Ab), 예를 들어 모노클로날 항체 (mAb), 및 대상체에게 항-CCR8 Ab를 단독요법으로서 또는 항암제, 예컨대 면역 체크포인트 억제제와 조합하여 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0008]

발명의 배경

[0009]

인간 암은, 면역계에 의해 잠재적으로 인식될 수 있는 신생항원을 생성하는 유전적 및 후성적 변형을 보유한다 (Chakravarthi et al., 2016). 암을 치료하기 위한 적응 면역계의 속성을 활용한다면 면역요법은 광범위한 암에 대한 그의 적용가능성에 있어서, 그리고 지속적인 항종양 효과를 유도하는 데 있어서 모든 암 치료 양식 중에서 특별한 것이 된다.

[0010]

다양한 고형 종양 및 혈액 악성종양을 치료하는 데 있어서 체크포인트 억제제, 예컨대 항-PD-1 Ab, 니볼루맵 (옵디보(OPDIVO)®) 및 항-CTLA-4 Ab, 이필리무맵 (예르보이(YERVOY)®)을 사용하여 세포독성 T 세포의 활성을 자극함으로써 이미 상당한 성공이 달성되었다. 그러나, 환자 중 전형적으로 약 15% 미만이 이러한 치료를 받을 수 있는 암에서 체크포인트 억제제를 사용한 치료로부터 장기간 이익을 얻으며 (Haslam and Prasad, 2019), 체크포인트 억제제는 유방암 및 전립선암을 포함한 특정 암에서 덜 효과적인 것으로 입증되었다. 면역억제 메카니즘, 특히 조절 T 세포 (Treg)에 의해 매개되는 것의 지속성은 체크포인트 억제제를 사용한 치료에 대한 특정 암 또는 특정 환자의 관찰된 저항성에 기여할 수 있다 (Fares et al., 2019; Han et al., 2019). 이러한 저항성을 극복하는 한 수단으로서, 본 출원은 Treg의 면역억제 효과를 감소시킴으로써 면역계를 자극하는 방법을 개시한다.

[0011]

CD4⁺ T 세포의 하위세트인 종양-침윤 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg는 면역학적 자기-관용의 매개자이다. Treg 발생 및 기능에 수반되는 유전자의 결핍은 마우스 (Fontenot et al., 2003; Khattri et al., 2003; Tivol et al., 1995) 및 인간 (Yagi et al., 2004; Kuehn et al., 2014) 둘 다에서 전신 자가면역을 유발하며, 이는 면역 항상성을 유지하는 데 있어서 Treg에 대한 중요한 비-중복 역할을 밝혀낸다. Treg는 이펙터 T 세포의 유도 및 증식의 하향조절, 케모카인 및 억제 시토카인의 분비, 및 수치상 세포 성숙 및 기능의 억제를 포함한 다중 메카니즘을 통해 면역계를 억제한다 (Shitara and Nishikawa, 2018; Han et al., 2019). 자기-관용을 촉진하기 위해 Treg에 의해 이용되는 메카니즘은 항종양 면역 반응을 억제하기 위해 종양 미세환경에서 공동-선택될 수 있다. 실제로, 마우스에서 Treg의 전신 고갈은 면역-매개 종양 퇴행을 가능하게 하기에 충분하다 (Teng et al., 2010). 따라서, Treg는 자기-항원에 대한 말초 관용을 매개하고, 자가면역 질환을 예방하고, 항종양 면역 반응을 억제하는 데 역할을 하는 것으로 생각된다.

[0012]

결과적으로, 종양-침윤 Treg의 활성 또는 수를 감소시키는 것은 종양 미세환경에서 면역억제 활성을 역전시키고 항종양 면역을 증대시키는 매력적인 접근법으로서 확인되었다 (Finotello and Trajanoski, 2017; Han et al., 2019). Treg 예컨대 CD25 (Arce Vargas et al., 2017), CCR4 (Ishida et al., 2012; Hagemann et al., 2014) 및 CTLA-4 (Korman et al., 2017) 상에서 발현되는 항원에 대한 항체 (Ab)를 사용한 Treg의 ADCC-매개 고갈, 및 E3 유비퀴틴 리가제 Siah2 (Scortegagna et al., 2020) 및 Yes-연관 단백질 (YAP; Ni et al., 2018)의 억제를 포함한 다양한 방법이 암 면역요법에서 Treg를 표적화하기 위해 사용되어 왔고 추구하고 있다. 그러나, 종양 미세환경으로부터 Treg를 특이적으로 표적화하거나 고갈시키기 위한 임상 시도는 성공적이지 않았다. IL-2에 융합된 디프테리아 독소 (테니류킨 디프티톡스)는 흑색종 환자에서 Treg 수를 효과적으로 감소시키는 데 실패하였고 (Luke et al., (2016)), 마우스 종양 모델에서 문서화된 항-CTLA-4 매개 Treg 고갈에도 불구하고 (Selby et al., 2013; Simpson et al., 2013), 인간 암에서 이필리무맵 또는 트레멜리무맵 (항-인간 CTLA-4 Ab)에 의한 Treg 고갈에 대한 명백한 증거는 불명확하다 (Sharma et al., 2019a; Sharma et al., 2019b). Treg 고갈은 비포코실화 (nf) 항-CCR4 Ab 모가몰리주맵으로 달성되었지만, 통상적인 CD4⁺ T 세포의 상당한 고갈 및 CD8⁺ T 세포 수의 보통의 감소가 또한 관찰되었으며 (Kurose et al., 2015), 이는 고형 종양의 치료에서의 그의 유용성을 제한한다. 따라서, 최적의 항종양 반응을 위해 T 이펙터 세포 (Teff)를 또한 보존하는 안전하고 효과적인 Treg 고갈제에 대한 필요가 남아있다.

[0013]

CCR8은, 종양-침윤 Treg에 대한 잠재적 특이적 마커로서 (CCR8 발현이 유방암, 결장직장암 및 폐암을 포함한 다발성 암 내 이들 Treg에서 선택적으로 상향조절되기 때문 (Plitas et al., 2016; De Simone et al., 2016;

Wang et al., 2019)), 그리고 IRF4-의존성 '이펙터' Treg 유전자 프로그램의 코어 구성원으로서 (Alvisi et al., 2020) 최근에 확인된 케모카인 수용체이다. 이들 CCR8⁺ Treg는 Treg의 고도로 활성화되고 억제성인 하위 집단을 나타내고, 이들 종양 유형에서 CCR8⁺ Treg의 높은 존재비는 불량한 예후와 연관된다 (Wang et al., 2019; De Simone et al., 2016). 따라서, CCR8은 항종양 면역을 증대시키기 위해 종양-상주 Treg의 고갈을 일으키는 유망한 치료 표적일 수 있다. CCR8을 표적화하는 것은, 억제성 Treg를 고갈시키면서, 또한 항종양 면역 반응을 유도하는 세포용해 이펙터 세포를 고갈시키지 않는 이점을 가질 수 있다. 더욱이, CCR8은 말초 혈액 또는 다른 조직에서 Treg 및 Teff 상에서 거의 발견되지 않기 때문에, CCR8⁺ 종양 Treg를 표적화하는 것은 최소 독성 위험을 제거할 수 있다.

[0014] CCR8은 주로 종양내 FOXP3^{hi} Treg 상에서 발견되는 7-막횡단 G-단백질-커플링된 케모카인 수용체 (GPCR)이다 (Wang et al., 2019; Plitas et al., 2016; De Simone et al., 2016). CCR8의 N-말단 및 ECL2 영역은 종양내 골수 세포 및 T 세포에 의해 생산되는 그의 기능적 리간드 C-C motif 케모카인 리간드 1 (CCL1)에 대한 결합에 중요하다. Treg의 종양 미세환경 (TME)으로의 이동에 영향을 미치는 것 외에도, CCL1:CCR8 상호작용은 또한 CCR8, FOXP3, IL-10, 및 다른 억제 인자의 상향조절을 통해 Treg의 면역억제 능력을 강화시킨다 (Vila-Caballer et al., 2019).

[0015] 최근에 허여된 미국 특허 번호 10,087,259는 종양-침윤 Treg 세포가 환자에서 정상-조직 침윤 T 세포보다 더 큰 정도로 특이적으로 고갈되도록 CCR8에 특이적으로 결합하는 Ab 작용제를 암 환자에게 투여함으로써 암을 치료하는 방법을 청구한다. 그러나, 이 특허는 CCR8에 특이적으로 결합하는 임의의 Ab 작용제를 예시하지도 않고, 항-CCR8 Ab를 대상체에게 투여함으로써 임의의 암을 치료하는 임의의 방법을 입증하지도 않는다.

[0016] 미국 특허 번호 10,550,191은 CCR8에 대한 Ab를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 청구한다. 실시예는 단일 Ab, 상업적으로 입수가 가능한 래트 IgG2b 항-마우스 CCR8 (항-mCCR8) Ab (클론 SA214G2; 바이오레전드(BioLegend), 캘리포니아주 샌디에고)이 마우스 종양 모델에서 다양한 종양의 부피를 감소시킨다는 것을 입증한다. 항-인간 CCR8 (항-hCCR8) Ab, 또는 인간 요법에 사용하기에 적합한 임의의 키메라, 인간화 또는 인간 Ab는 개시되어 있지 않다.

[0017] PCT 공개 번호 WO 2018/112033은 표 1 또는 2에 포함된 특정 유전자 생성물을 발현하는 종양-침윤 Treg 세포에서 세포독성을 유도하고, 이에 의해 대상체에서 종양-침윤 Treg 세포의 수 또는 활성을 감소시키는 작용제를 대상체에게 투여함으로써 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. CCR8은 표 1 또는 2에 포함된 유전자 생성물이 아니지만, 실시예 8은 마우스 MC38 결장 선암종 모델에서 항-mCCR8 Ab의 중간 수준의 항종양 활성을 입증한다.

[0018] PCT 공개 번호 WO 2019/157098은 제조함 리스테리아(*Listeria*) 균주 및 항-CCR8 Ab를 포함하는 면역원성 조성물, 및 이러한 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양을 치료하는 방법에 관한 것이다. 미국 특허 번호 10,550,191과 유사하게, WO 2019/157098에는 어떠한 항-CCR8 Ab의 생성도 보고되어 있지 않지만, 대신 마우스 모델에서 이식된 결장 암종 종양을 치료하기 위한, 리스테리아-기반 면역요법과 조합된 상업용 SA214G2 항-mCCR8 Ab의 용도가 입증되어 있다.

[0019] 보다 최근에, 다양한 그룹이 종양-연관 Treg를 고갈시키고 암을 치료하는 데 사용하기 위한 인간화 항-CCR8 Ab의 생성을 보고하였다 (예를 들어, 문헌 [Depis et al., 2020; WO 2020/138489; Harbour BioMed, 2020] 참조).

[0020] 본원에 개시된 발명은 CCR8 발현이 다양한 종양 유형으로부터의 종양 Treg에 고도로 제한된다는 것을 입증한다. 본 발명은 항-CCR8 Ab, 구체적으로 항-CCR8 mAb (인간, 인간화 및 키메라 항-hCCR8 mAb 포함)의 생산을 포함하고, 마우스 종양 모델에서 항-CCR8-매개 Treg 고갈이 Fc 결속을 필요로 한다는 것을 입증한다. 본 개시내용은 또한 생체의 인간 종양 배양 시스템에서 종양-특이적 Treg 고갈을 매개하는 nf 항-hCCR8 Ab의 개발을 기재한다. 단독요법으로서의 또는 체크포인트 차단, 예를 들어 PD-1/PD-L1 신호전달 경로의 억제와 조합된 항-CCR8 Ab 치료는 강력한 항종양 반응을 유도하고, 항-PD-1 단독요법에 반응하지 않는 환자에게 임상 이익을 제공할 수 있다. 항-CCR8-매개 Treg 고갈 및 체크포인트 차단의 작용 메커니즘의 조합은 종양 세포의 사멸을 증가시켜 이에 의해 광범위한 암을 치료하는 특별한 기회를 제공한다.

발명의 내용

[0021] 발명의 요약

[0022] 본 발명은 세포의 표면 상에 발현된 CCR8, 예컨대 인간 CCR8 (hCCR8)에 특이적으로 결합하고, 치료적 Ab에서 바

람직한 특성을 포함한 다양한 기능적 특성을 나타내는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb를 제공한다. 이들 특성은 CCR8-발현 세포, 예컨대 종양-침윤, 활성화된 $CD4^{+}FOXP3^{high}$ Treg에 대한 높은 친화도로의 결합; Treg이외에, 흉선의 수질 및 피부의 진피에서 회귀하고 산란된 면역 세포에만 결합하지만 많은 다른 조직에는 결합하지 않는 것; ADCC에 의한 CCR8-발현 세포, 예컨대 종양-침윤, 활성화된 $CD4^{+}FOXP3^{high}$ Treg의 고갈을 매개하는 것; 정상 조직에서 종양-침윤 Treg의 고갈을 특이적으로 매개하지만 $CCR8^{+}$ T 세포에는 그렇지 않은 것; CCR8에 대한 CCL1의 결합을 억제하고 CCR8/CCL1 신호전달을 억제하는 것; 가교 Ab의 존재 또는 부재 하에 세포의 표면 상에서 CCR8에 결합될 때 CCR8의 내재화를 유발하지 않는 것; 시험관내 및 인간 종양 생체의 조직 샘플에서 $CCR8^{+}$ Treg의 특이적 고갈을 매개하는 것; 및 대상체에게 단독요법으로서 또는 또 다른 항암제와 조합하여 투여될 때 대상체, 바람직하게는 인간 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 것을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 항-CCR8 Ab는 변형되지 않은 mAb와 비교하여 $Fc\gamma$ 수용체 ($Fc\gamma R$)에 더 높은 친화도로 결합하고 증진된 ADCC를 매개하는, 변형된 중쇄 불변 영역, 예컨대 저푸코실화 또는 비푸코실화 (nf) 중쇄 불변 영역을 포함하는 변형된 mAb이다.

[0023] 구체적으로, 본 개시내용은 세포의 표면 상에 발현된 CCR8에 특이적으로 결합하고 ADCC에 의한 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다. 특정 실시양태에서, CCR8은 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 갖는 hCCR8이다. 특정의 다른 실시양태에서, Ab, 예를 들어 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 IgG1 또는 IgG3 이소형의 중쇄 불변 영역을 포함한다.

[0024] 본 개시내용은 또한 비변형된 mAb 또는 그의 항원-결합 부분과 비교하여 $Fc\gamma$ 수용체 ($Fc\gamma R$)에 더 높은 친화도로 결합하고 증진된 ADCC를 매개하는 변형된 중쇄 불변 영역을 포함하는 변형된 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 변형된 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 감소된 푸코실화를 나타내는 변형된 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 hCCR8의 N-말단 펩티드에 결합하며, 여기서 에피토프는 서열 $Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$ (서열식별번호: 2)을 갖는 펩티드 내의 적어도 1개의 아미노산을 포함하고, 황산화 tyr-15 및/또는 황산화 tyr-17 잔기를 추가로 포함한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 hCCR8의 N-말단 펩티드에 결합하며, 여기서 에피토프는 서열 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (서열식별번호: 109)을 갖는 펩티드 내의 적어도 1개의 아미노산을 포함하고, 황산화 tyr-15 및 황산화 tyr-17 잔기를 추가로 포함한다.

[0025] 특정 실시양태에서, 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 하기 특성 중 적어도 하나, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7개 또는 모두를 나타낸다: (a) 세포의 표면 상에 발현된 CCR8에 약 1 nM 이하의 EC_{50} 또는 약 2 nM 이하의 EC_{50} 으로 특이적으로 결합함; (b) 흉선의 수질 및 피부의 진피에서 회귀하고 산란된 면역 세포에 결합하지만, 인간 대뇌, 소뇌, 심장, 간, 폐, 신장, 편도, 비장, 흉선, 결장, 위, 췌장, 부신, 뇌하수체, 피부, 말초 신경, 고환 또는 자궁 조직, 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에는 결합하지 않음; (c) CCR8에 대한 CCL1의 결합을 억제하고, CCR8/CCL1 신호전달을 약 5 nM 이하의 IC_{50} 으로 억제함; (d) 세포의 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때, 약 10 pM 이하의 EC_{50} 또는 약 60 pM 이하의 EC_{50} 으로 세포의 고갈을 매개함; (e) 대상체에게 투여되었을 때, 종양-침윤 Treg의 고갈을 매개하지만, 비장, 혈액, 피부 또는 흉선에서 $CCR8^{+}$ T 세포를 실질적으로 보존함; (f) 세포의 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때, 가교 Ab의 존재 또는 부재 하에 CCR8의 내재화를 유발하지 않음; (g) 대상체에게 단독요법으로서 투여되었을 때 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제함; 및 (h) 대상체에게 암을 치료하기 위한 추가의 치료제, 예컨대 면역 체크포인트 억제제와 조합하여 투여되었을 때 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제함.

[0026] 특히, 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 적어도 하기 특성을 나타낸다: (a) 세포의 표면 상에 발현된 CCR8에 약 1 nM 이하의 EC_{50} 또는 약 2 nM 이하의 EC_{50} 으로 특이적으로 결합함; (b) CCR8에 대한 CCL1의 결합을 억제하고, CCR8/CCL1 신호전달을 약 5 nM 이하의 IC_{50} 으로 억제함; (c) 세포의 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때, 약 10 pM 이하의 EC_{50} 또는 약 60 pM 이하의 EC_{50} 으로 세포의 고갈을 매개함; (d) 대상체에게 투여되었을 때, 종양-침윤 Treg의 고갈을 매개하지만, 비장, 혈액, 피부 또는 흉선에서 $CCR8^{+}$ T 세포를 실질적으로 보존함; (e) 대상체에게 단독요법으로서 투여되었을 때 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제함; 및 (f) 대상체에게 암을 치료하기 위한 추가의 치료제, 예컨대 면역 체크포인트 억제제와 조합하여 투여되

있을 때 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제함.

[0027] 다른 실시양태에서, 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 적어도 하기 특성을 나타낸다: (a) 세포의 표면 상에 발현된 CCR8에 약 1 nM 이하의 EC_{50} 또는 약 2 nM 이하의 EC_{50} 으로 특이적으로 결합함; (b) 세포의 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때, 약 10 pM 이하의 EC_{50} 또는 약 60 pM 이하의 EC_{50} 으로 세포의 고갈을 매개함; (c) 대상체에게 투여되었을 때, 중앙-침윤 Treg의 고갈을 매개하지만, 비장, 혈액, 피부 또는 흉선에서 CCR8⁺ T 세포를 실질적으로 보존함; 및 (d) 대상체에게 암을 치료하기 위한 추가의 치료제, 예컨대 면역 체크포인트 억제제와 조합하여 투여되었을 때 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제함.

[0028] 이들 특성은, 예를 들어 본원에서 14S15 및 4A19로 지칭된 것을 포함한 본 발명의 특정 Ab에 대해 상세히 조사되었다. mAb 4A19는 nf 인간화 Ab인 반면, mAb 14S15는 인간 Fc 영역 상에 그래프팅된 마우스 Fab 단편을 포함하는 nf 키메라 Ab이고, 본원에 기재된 여러 검정을 14S15 및 4A19를 포함하는 mAb를 사용하여 수행하였다. 이어서, 가장 가까운 인간 배선 서열에 상응하도록 프레임워크 서열을 변형시킴으로써 14S15 mAb를 인간화시켜 14S15h로 지칭된 Ab를 생성하였다 (실시예 10 참조). 중쇄 가변 도메인의 친화도 성숙 후에 생산된 인간화 mAb의 최종 반복은 hCCR8에 대한 결합 친화도를 이 Ab의 원래의 마우스 또는 키메라 버전에 필적할만하게, 사실상 그보다 약간 더 높게 나타냈다 (14S15h Fab 단편에 대해 0.64 nM vs. 출발 마우스 mAb에 대해 1.4 nM의 K_D). 따라서, 14S15h는 키메라 14S15 mAb로 입증된 것과 동일하거나 매우 유사한 기능적 특성을 나타낼 것으로 예상된다. 따라서, 상기 언급된 기능적 특성은 단독으로 또는 조합하여, mAb 14S15, 14S15h 및 4A19의 구조적 특색과 조합하여 존재할 수 있다.

[0029] 예를 들어, 본 발명의 특정 실시양태에서, Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 상기 특성 중 하나 이상 (예를 들어, 상기 특성 중 적어도 2, 3, 4, 5 또는 6개)을 포함할 수 있고, 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 각각에서의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 카바트 방법에 의해 정의된 바와 같은 하기 CDR 도메인을 포함할 수 있다: 서열식별번호: 33으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR1; 서열식별번호: 34로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR2; 서열식별번호: 35로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR3; 서열식별번호: 36으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR1; 서열식별번호: 37로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR2; 및 서열식별번호: 38로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR3. 추가의 예로서, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 이러한 Ab는 서열식별번호: 100으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 112로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 임의로, Ab는 그의 중쇄의 감소된 푸코실화를 갖거나, 또는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 저푸코실화 또는 비푸코실화 중쇄 불변 영역을 갖는다.

[0030] 예를 들어, 본 발명의 특성의 다른 실시양태에서, Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 상기 특성 중 하나 이상 (예를 들어, 상기 특성 중 적어도 2, 3, 4, 5 또는 6개)을 포함할 수 있고, 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 각각에서의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 카바트 방법에 의해 정의된 바와 같은 하기 CDR 도메인을 포함할 수 있다: 서열식별번호: 103으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR1; 서열식별번호: 104로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR2; 서열식별번호: 105로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR3; 서열식별번호: 106으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR1; 서열식별번호: 107로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR2; 및 서열식별번호: 108로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR3. 추가의 예로서, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연

결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 이러한 Ab는 서열식별번호: 117로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 118로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 임의로, Ab는 그의 중쇄의 감소된 푸코실화를 갖거나, 또는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 저푸코실화 또는 비푸코실화 중쇄 불변 영역을 갖는다.

[0031] 예를 들어, 본 발명의 특징의 다른 실시양태에서, Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 상기 특성 중 하나 이상 (예를 들어, 상기 특성 중 적어도 2, 3, 4, 5 또는 6개)을 포함할 수 있고, 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 각각에서의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 카바트 방법에 의해 정의된 바와 같은 하기 CDR 도메인을 포함할 수 있다: 서열식별번호: 45로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR1; 서열식별번호: 46으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR2; 서열식별번호: 47로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR3; 서열식별번호: 48로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR1; 서열식별번호: 49로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR2; 및 서열식별번호: 50으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR3. 추가의 예로서, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 이러한 Ab는 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 임의로, Ab는 그의 중쇄의 감소된 푸코실화를 갖거나, 또는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 저푸코실화 또는 비푸코실화 중쇄 불변 영역을 갖는다.

[0032] 본 개시내용은 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하고, 각각의 하기 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 쌍 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 추가로 제공한다:

[0033] (a) 서열식별번호: 3으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 15로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

[0034] (b) 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

[0035] (c) 서열식별번호: 5로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 17로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

[0036] (d) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

[0037] (e) 서열식별번호: 7로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 19로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

[0038] (f) 서열식별번호: 8로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 20으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

[0039] (g) 서열식별번호: 9로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 21로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

[0040] (h) 서열식별번호: 10으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 22

로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

- [0041] (i) 서열식별번호: 11로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 23으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0042] (j) 서열식별번호: 12로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 24로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0043] (k) 서열식별번호: 13으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 25로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0044] (l) 서열식별번호: 14로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 26으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ; 또는
- [0045] (m) 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L .
- [0046] 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하고, 각각의 하기 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 쌍 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분이 특정한 예이다:
- [0047] (a) 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0048] (b) 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ; 및
- [0049] (c) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L .
- [0050] 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하고, 하기 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 쌍 내의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분이 특정한 예이다:
- [0051] (a) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L .
- [0052] CDR의 서열은 카바트(Kabat), 코티아(Chothia), AbM, 접촉 및 IMGT 정의를 포함한 다양한 방법에 의해 정의될 수 있다. 달리 명백하게 나타내지 않는 한, 본 개시내용에서의 CDR은 카바트 정의에 의해 확인되었다.
- [0053] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 임의의 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 본 개시내용은 상기 단리된 핵산을 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 상기 숙주 세포는 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분의 제조 방법에 사용될 수 있고, 상기 방법은 상기 숙주 세포에서 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 발현시키고, 숙주 세포로부터 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 단리하는 것을 포함한다.
- [0054] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 암을 앓고 있는 대상체에게, 예를 들어 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 본원에 기재된 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분의 치료 유효량을 투여하여 상기 대상체를 치료하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 예를 들어 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 치료 유효량의 본원에 기재된 항-CCR8 mAb 또는 항원-결합 부분을 대상체에게 투여하여 대상체에서 종양 세포의 성장이 억제되도록 하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 이들 방법의 특정 실시양태에서, 항-CCR8 mAb는, 세포의 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때, 약 10 pM 이하의 EC_{50} 으로 세포의 고갈을 매개한다. 특정의 다른 실시양태에서, 항-CCR8 mAb는, 세포의 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때, CCR8에 대한 CCL1의 결합을 억제하고, CCR8/CCL1 신호전달을 약 5 nM 이하의 IC_{50} 으로 억제한다. 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위한, 또

는 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법에 사용하기 위한, 예를 들어 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 본원에 기재된 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 제공하며, 각각의 방법은 대상체에게 치료 유효량의 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 투여하는 것을 포함한다.

[0055] 본 개시내용은 암을 앓고 있는 대상체에게 치료 유효량의 (a) 예를 들어 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 본원에 기재된 항-CCR8 Ab, 예를 들어 mAb 또는 그의 항원-결합 부분, 및 (b) 암을 치료하기 위한 추가의 치료제의 조합물을 투여하는 것을 포함하며, 임의로 여기서 추가의 치료제는 면역계의 억제를 감소시키거나 또는 그의 자극을 증가시키는 화합물인, 상기 대상체를 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 추가의 치료제는 PD-1, PD-L1, 또는 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 길항작용 Ab 또는 그의 항원-결합 부분이다. 방법은 또한 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법일 수 있다.

[0056] 이러한 방법이 치료제의 조합의 사용을 수반하는 경우에, 이들은 상이한 방식으로 지칭될 수 있다. 예를 들어, 치료 방법이, 예를 들어 암을 치료하기 위해 작용제 (A) 및 (B)를 사용하는 경우에, 이는: (i) 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 작용제 (A) 및 작용제 (B); (ii) 암을 치료하는 방법에서 작용제 (B)와 함께 사용하기 위한 작용제 (A); 또는 (iii) 암을 치료하는 방법에서 작용제 (A)와 함께 사용하기 위한 작용제 (B)를 지칭할 수 있다. 따라서, 상기 조합은 하기를 지칭할 수 있다:

[0057] (i) 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 또는 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법에 사용하기 위한 (A) 예를 들어 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분, 및 (B) 암을 치료하기 위한 추가의 치료제 (상기 방법은 대상체에게 치료 유효량의 (A) 예를 들어 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분, 및 (B) 암을 치료하기 위한 추가의 치료제의 조합물을 투여하는 것을 포함함); 또는

[0058] (ii) 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 또는 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법에 사용하기 위한, (B) 암을 치료하기 위한 추가의 치료제와 함께 사용하기 위한 (A) 예를 들어 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분 (상기 방법은 대상체에게 치료 유효량의 (A) 예를 들어 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분, 및 (B) 암을 치료하기 위한 추가의 치료제의 조합물을 투여하는 것을 포함함); 또는

[0059] (iii) 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 또는 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법에 사용하기 위한, (A) 예를 들어 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분과 함께 사용하기 위한 (B) 암을 치료하기 위한 추가의 치료제 (상기 방법은 대상체에게 치료 유효량의 (B) 암을 치료하기 위한 추가의 치료제 및 (A) 예를 들어 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분의 조합물을 투여하는 것을 포함함).

[0060] 본 개시내용은 또한 (a) 세포의 표면 상에 발현된 CCR8에 특이적으로 결합하고 ADCC에 의한 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는, 약 0.01 내지 약 20 mg/kg 체중, 또는 약 0.1 내지 약 2,000 mg 고정 용량 범위의 하나 이상의 투여량의 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분; (b) 임의로, PD-1, PD-L1 또는 CTLA-4에 특이적으로 결합하는, 약 200 내지 약 1600 mg 범위의 하나 이상의 투여량의 mAb 또는 그의 항원-결합 부분; 및 (c) 본원에 개시된 치료 방법에서 CCR8에 특이적으로 결합하는 단리된 Ab 또는 그의 부분, 및 임의로 PD-1, PD-L1 또는 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 mAb 또는 그의 부분을 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 키트를 제공한다.

[0061] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기 상세한 설명 및 실시예로부터 명백할 것이며, 이는 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 과학 논문, 진뱅크(GenBank) 등록물, 특허 및 특허 출원을 포함, 인용된 모든 참고문헌의 내용은 명시적으로 본원에 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1A-1C는 더 캔서 게놈 아틀라스(The Cancer Genome Atlas; TCGA)에서의 인간 CCR8 및 FOXP3 유전자-유전자 상관관계의 분석을 나타낸다. A: 모든 비-혈(heme) TCGA 종양 RNA-seq에 걸친 유전자-유전자 상관관계의 상호 순위-기반 네트워크는 CCR8을 Treg-선택적 마커로서 확인한다. B: 간세포성 암종 (HCC) 단일 세포 RNA-seq의 분석은 CCR8이 HCC 종양 샘플에서 FOXP3^{high} 림프구 상에서 선택적으로 발현된다는 것을 입증한다. C: FOXP3⁺ T 림프구에서 수행된 스피어만(Spearman) 상관관계 분석은 CCR8 발현이 보다 높은 수준의 FOXP3 발현과 연관된다는 것을 보여준다.

도 2A-2F는 CCR8 발현이 다른 Treg-표적화된 분자와 비교하여 종양 Treg 상에 풍부함을 보여준다. A: 암 환자 (결장직장암, 신장암, 폐암 및 흑색종)의 종양 및 혈액으로부터의 Treg에서의 CCR8, CCR4, CTLA-4 및 CD25 양성 빈도의 유동 세포측정법 분석 ($n = 8-18$). B: 암 환자의 혈액 ($n = 6-10$) 및 종양 ($n = 7-20$)으로부터의 $CD4^{+}FOXP3^{+}$ Treg 상에서의 Treg 표적의 상대적 발현 수준 (MFI). C-E: 암 환자의 종양 (C) 및 혈액 (D)으로부터의 $CD4^{+}$ Tconv, 및 종양 (E) ($n = 7-17$) 및 말초 혈액 샘플 (F) ($n = 5-13$)로부터의 $CD8^{+}$ T 세포에 대한 Treg 표적 빈도. 모든 마커가 모든 환자에 대해 분석되지는 않았고, 모든 환자가 매칭되는 혈액 샘플을 갖는 것은 아니었다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. A-B: 이원 ANOVA에 이어 본페로니(Bonferroni) 다중 비교 검정; C-F: 일원 ANOVA 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 검정에 이어 던(Dunn) 다중 비교.

도 3A-3C는 CCR8이 종양-침윤 Treg 상에서 고도로 발현된다는 것을 입증하는 유동 세포측정 분석을 보여준다. CCR8의 발현 수준을 상이한 T 세포 집단에서 측정하였다. A: CCR8을 발현하는 종양-침윤 T 림프구 하위세트의 백분율. 통상적인 $CD4^{+}FOXP3^{-}$ ($CD4$ Tconv) T 세포 및 $CD8^{+}$ T 세포 ($CD8$)와 비교하여 유의하게 더 높은 빈도의 종양-침윤 Treg이 CCR8을 발현한다. B: 종양-침윤 T 림프구 서브세트와 결합된 PE-접합된 항-CCR8 Ab의 평균 형광 강도 (MFI). 종양 Treg는 또한 $CD4$ Tconv 및 $CD8$ 세포와 비교하여 세포당 기준으로 보다 높은 수준의 CCR8을 발현한다. C: 암 환자의 혈액 및 종양 조직에서 $CCR8^{+}$ Treg 상의 Treg CCR8 발현 수준의 비교. CCR8의 발현은 종양-침윤 Treg 상에서 유의하게 더 높은 수준인 반면 말초 혈액 내의 Treg 상에서 낮은 수준이다.

도 4A-4D는 CCR8이 상이한 Treg 하위집단 상에서 차별적으로 발현된다는 것을 보여준다. A: CCR8을 발현하는 건강한 대장체로부터의 PBMC 내의 상이한 T 세포 집단 내의 세포의 백분율. CCR8은 주로 말초 Treg 상에서 발현된다. B: CCR8을 발현하는 건강한 대장체에서의 상이한 Treg 하위집단 내의 세포의 백분율. Treg 집단 내에서, CCR8은 이펙터 기억 집단 (EM)에서 보다 고도로 발현되고, 중심 기억 세포 (CM)에서는 보다 적은 정도로 발현되며, CCR8은 나이브 Treg에서 거의 발현되지 않는다. C: CCR8을 발현하는 통상적인 $CD4$ Tconv 세포 내의 세포의 백분율. 이들 $CD4$ Tconv 세포의 임의의 하위집단에서 CCR8 발현은 거의 없다. D: 말초 혈액으로부터의 $CCR8^{+}$ Treg 또는 암 환자로부터의 종양-침윤 Treg에 결합된 항-CCR8 Ab의 평균 형광 강도 (MFI). 암 환자에서, 말초 혈액으로부터의 Treg보다 종양-침윤 Treg에 대해 세포당 기준으로 더 높은 CCR8 발현이 존재한다.

도 5는 CCR8이 가장 면역억제성인 $CD4^{+}FOXP3^{high}$ Treg 집단에서 발현된다는 것을 보여준다. 2명의 흑색종 환자 및 1명의 신세포 암종 (RCC) 환자로부터의 종양을 해리시키고, FOXP3 및 CCR8 발현에 대해 염색하였다. CCR8은 가장 활성화된 Treg를 나타내는 $CD4^{+}FOXP3^{high}$ 집단에 의해 주로 발현된다.

도 6A-6D는 CD25, CD39 및 IL1R2를 발현하는 $CCR8^{+}$ 및 $CCR8^{-}$ T 세포의 백분율을 나타낸다. A: CD25를 발현하는 $CCR8^{+}$ 및 $CCR8^{-}$ 세포의 백분율; B: CD39를 발현하는 $CCR8^{+}$ 및 $CCR8^{-}$ 세포의 백분율; C: IL1R2를 발현하는 $CCR8^{+}$ 및 $CCR8^{-}$ 세포의 백분율; D: IL1R2를 발현하는 자극된 $CCR8^{+}$ 및 $CCR8^{-}$ 세포의 백분율.

도 7A-7D는 CD25, CD39 및 IL1R2를 발현하는 $CCR4^{+}$ 및 $CCR4^{-}$ T 세포의 백분율을 나타낸다. A: CD25를 발현하는 $CCR4^{+}$ 및 $CCR4^{-}$ 세포의 백분율; B: CD39를 발현하는 $CCR4^{+}$ 및 $CCR4^{-}$ 세포의 백분율; C: IL1R2를 발현하는 $CCR4^{+}$ 및 $CCR4^{-}$ 세포의 백분율; D: IL1R2를 발현하는 자극된 $CCR4^{+}$ 및 $CCR4^{-}$ 세포의 백분율.

도 8A 및 8B는 활성화 마커 HLA-DR을 발현하는 $CCR8^{+}$ 및 $CCR8^{-}$ T 세포의 백분율 (8A), 및 이러한 마커를 발현하는 $CCR4^{+}$ 및 $CCR4^{-}$ T 세포의 백분율 (8B)을 나타낸다.

도 9A-9C는 IFN γ , IL-2, 및 그랜자임 B를 발현하는 자극된 $CCR8^{+}$ 및 $CCR8^{-}$ T 세포의 백분율을 나타낸다. A: IFN γ 를 발현하는 자극된 $CCR8^{+}$ 및 $CCR8^{-}$ 세포의 백분율; B: IL-2를 발현하는 자극된 $CCR8^{+}$ 및 $CCR8^{-}$ 세포의 백분율; C: 그랜자임 B를 발현하는 자극된 $CCR8^{+}$ 및 $CCR8^{-}$ 세포의 백분율.

도 10A-10C는 IFN γ , IL-2, 및 그랜자임 B를 발현하는 자극된 $CCR4^{+}$ 및 $CCR4^{-}$ T 세포의 백분율을 나타낸다. A: IFN γ 를 발현하는 자극된 $CCR4^{+}$ 및 $CCR4^{-}$ 세포의 백분율; B: IL-2를 발현하는 자극된 $CCR4^{+}$ 및 $CCR4^{-}$ 세포의 백

분율; C: 그랜자임 B를 발현하는 자극된 $CCR4^+$ 및 $CCR4^-$ 세포의 백분율.

도 11A 및 11B는 hCCR8-발현 세포주 또는 활성화된 인간 Treg에 대한 상이한 항-hCCR8 mAb의 결합을 보여준다. A: hCCR8-형질감염된 세포주 (293F, CHO, Raji) 및 활성화된 인간 Treg에 대한 다양한 범위의 결합 친화도 (EC_{50} 빈 (nM))를 나타내는 항-hCCR8 Ab를 생성하였다. B: 활성화된 Treg에 결합하는 항-CCR8 mAb의 선택된 하위세트의 EC_{50} 값 (nM)이 제시된다.

도 12A 및 12B는 hCCR8 N-말단 펩티드에 결합된 4A19 Fab 단편의 결정 구조를 보여준다. A: 2.03 Å 분해능에서 단일 황산화된 (tyr-17에서) hCCR8 N-말단 펩티드에 결합된 4A19 Fab 단편. 4A19 mAb에 의해 결합된 에피토프는 에피토프의 중심에 황산화 티로신-17 잔기를 갖는 잔기 15-21을 포함한다; B: 1.80 Å 분해능에서 이중 황산화 (tyr-15 및 tyr-17에서) hCCR8 N-말단 펩티드에 결합된 4A19 Fab 단편. 4A19 mAb에 의해 결합된 에피토프는 잔기 12-22를 포함한다.

도 13A 및 13B는 각각 정상 인간 PBMC 및 정상 인간 흉선에 대해 1 µg/ml (상부 패널) 및 3 µg/ml (상부 패널)로 적용된 상이한 항-hCCR8 mAb의 조직 교차-반응성을 나타낸다. A: PBMC에 대한 mAb 18Y12 (좌측 패널), 16B13 (중간 패널) 및 4A19 (우측 패널)의 결합. mAb 18Y12 및 4A19는 PBMC에 결합하지 않는 반면, 16B13은 CCR8일 가능성이 없는 표적에 대해 고수준 결합을 나타낸다. B: 흉선 조직에 대한 mAb 18Y12 (좌측 패널), 16B13 (중간 패널) 및 4A19 (우측 패널)의 결합. mAb 18Y12는 어떠한 염색도 나타내지 않는 반면, 흉선의 수질에서 희귀하고 산란된 면역 세포에서 mAb 4A19에 의해 양성 염색이 관찰되었다. mAb 16B13은 흉선에서 대다수의 면역 세포에서 강렬하고 확산된 염색을 나타내며, 우세한 세포질 및/또는 핵주위 패턴을 갖는다.

도 14A-14C는 항-hCCR8 mAb가 hCCR8에 대한 인간 CCL1 (hCCL1)의 결합을 차단함을 보여준다. A: 항-hCCR8 mAb는 Ca 유동의 억제에 의해 평가할 때 hCCR8-형질감염된 CHO 세포 상의 hCCR8에 대한 hCCL1의 결합을 차단하는 다양한 능력을 나타낸다. B: 7종의 선택된 항-hCCR8 Ab에 대한 CCL1 신호전달의 차단 백분율 (CCL1-유도된 Ca 유동)이 제시된다. C: Ca 유동-차단 IC_{50} 곡선이 4종의 선택된 항-CCR8 mAb에 대해 제시된다.

도 15A 및 15B는 항-hCCR8 mAb가 항-CCR8 mAb의 ADCC 잠재력을 반영하는 CD16 발현 리포터 세포의 CD16 가교를 매개함을 보여준다. CD16-발현 루시페라제 리포터 세포와 CCR8-발현 Raji 세포 또는 활성화된 Treg의 공동-배양물을 항-CCR8 Ab (비펩코실화 (nf) 또는 야생형 hIgG1 백본을 가짐)로 처리하였다. A: CD16 가교 능력의 범위를 관찰하였다. B: hIgG1-nf 백본을 갖는 항-hCCR8 mAb의 선택 세트에 대한 표적으로서 활성화된 Treg를 사용하는 CD16 가교가 도시된다.

도 16은 항-CCR8 Ab가 동종 NK 세포에 의한 활성화된 Treg의 사멸을 매개함을 보여준다. 활성화된 Treg를 프라이밍된 동종 NK 세포 및 적정된 항-hCCR8 Ab와 공동-배양하였다. 세포 사멸을 Treg에 대한 아넥신-V 양성에 의해 측정하였다.

도 17A 및 17B는 항-CCR8 mAb가 시험관내에서 동종 NK 세포에 의한 환자 종양 Treg의 사멸을 매개한다는 것을 보여준다. 효소적으로 해리된 환자 자궁내막 종양을 프라이밍된 동종 NK 세포와 37°C에서 24시간 동안 공동-배양하였다. 항-CCR8 Ab인 14S15는 환자 종양 Treg를 특이적으로 고갈시켰지만 (도 17A), 통상적인 $CD4^+$ T 세포는 그렇지 않았다 (도 17B). 대조적으로, 항-CCR4 Ab (CCR4)는 Treg 및 통상적인 $CD4^+$ T 세포 둘 다의 고갈을 매개하였다 (도 17A 및 17B).

도 18A-18I는 항-hCCR8-hIgG1-nf Ab가 동종 NK 세포의 첨가 없이 생체외 환자 종양 슬라이스 배양 시스템에서 $CCR8^+$ Treg 고갈을 매개함을 보여준다. A-C: 시험관내 14S15-IgG1-nf 또는 항-hCCR4-IgG1-nf로의 처리 시 말초 혈액 Treg (A), $CD4^+$ Tconv (B) 및 $CD8^+$ T 세포 (C)의 고갈에 대한 대표적인 결과. D-F: 14S15-IgG1-nf (D), 항-hCCR4-IgG1-nf (E), 및 이소형 (F) Ab를 비교하는, 비소세포 폐 암종 (NSCLC) 종양 및 동종 NK 세포 사멸 검정으로부터의 대표적인 플롯. A-F: 14S15-IgG1-nf, 막힌 원; 항-hCCR4-IgG1-nf, 정사각형; 이소형 IgG1-nf, 빈 원. G: 16B13-IgG1-nf를 항-hCCR8-불활성 Ab 및 이소형 대조군 Ab와 비교하는 동종 NK 및 NSCLC 종양 공동-배양. G: 이소형 IgG1-nf, 빈 원; 14S15-IgG1-nf, 막힌 원; 14S15-IgG1-불활성, 삼각형. H 및 I: 16B13-IgG1-nf 또는 IgG1-nf 이소형 대조군의 존재 하에 24시간 동안 배양된 신세포 암종 (H) 및 위암 (I)으로부터의 생체외 1차 무손상 종양 절편으로부터의 결과 (각각의 조건에 대해 3-5회의 기술적 반복실험). H 및 I: 이소형 IgG1-nf, 빈 원; 14S15-IgG1-nf, 빈 원. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$. 터키(Tukey) 다중 비교 검정을 사용한 통상의 일원 ANOVA (G). 만-휘트니 검정 (양측) (G-I).

도 19는 항-CCR8 Ab가 가교의 존재 또는 부재 하에 활성화된 Treg 상에서 CCR8 내재화를 유도하지 않음을 보여준다. 활성화된 Treg를 항-인간 Fc 가교 Ab의 존재 또는 부재 하에 항-CCR8 mAb 4A19, 양성 대조군 Ab (항-ICOS), 및 이소형 대조군과 함께 인큐베이션하였다. Treg 표면 상의 CCR8 발현을 다양한 시점에 평가하였다.

도 20A-20D는 소화된 환자 종양이 시험관 내에서 동종 자연 킬러 (NK) 세포와 공동-배양될 때의 항-CCR8에 의한 종양 Treg의 고갈을 나타낸다. A: mAb 4A19 (CCR8-nf)는 비푸코실화 항-hCCR4 mAb (CCR4-nf)에 의해 유발된 고갈보다 환자 종양 Treg의 측정가능한 고갈을 더 유도하였다. B: 반대로, 항-CCR4-nf Ab는 $CD4^{+}$ Teff 세포의 고갈을 유도하였지만, mAb 4A19는 그렇지 않았다. C: 항-CCR8도 항-CCR4도 $CD8^{+}$ Teff를 고갈시키지 않았다. D: 4A19 (CCR8-nf)와 대조적으로, 비관련 표적화 아암 (이소형)을 갖는 대조군 항-키홀 림프 헤모시아닌 (KLH)-nf mAb도, 불활성 백본 (CCR8-불활성)을 갖는 4A19 mAb도 Treg를 고갈시키지 않았다.

도 21A-21D는 항-CCR8이 마우스 모델에서 CT26 결장암의 성장을 억제함을 보여준다. A: 바이오레전드의 래트 항-mCCR8 mAb로부터 유래된 mIgG2a 이소형을 갖는 항-mCCR8 Ab인 항-CCR8-mIgG2a, 클론 SA214G2를 사용한 CT26 결장암의 치료는 종양 성장을 유의하게 감소시켰고, 무종양 마우스의 수를 증가시켰다. 개별 종양 부피가 도시된다. B: 평균 종양 부피의 변화. C: 종양 Treg 고갈은 항-CCR8 처리에 의해 관찰된 반면, 비장 Treg의 수는 항-CCR8 처리에 의해 영향을 받지 않았다 (D).

도 22A-22F는 유동 세포측정법에 의해 분석할 때 CT26 결장 선암종을 갖는 마우스에서 T 림프구 집단에 대한 항-CCR8의 효과를 보여준다. A: 비장, 혈액, 종양 Treg 및 피부에서의 CCR8-발현 $CD4^{+}FOXP3^{+}$ Treg (Treg), $FOXP3^{+}CD4^{+}$ 이펙터 세포 ($CD4^{eff}$), 및 $CD8^{+}$ T ($CD8T$) 세포의 백분율. B: CCR8-발현 이중 음성 $CD4^{-}CD8^{-}$ (DN), 단일 양성 $CD4^{+}CD8^{-}$ ($CD4$ SP), 단일 양성 $CD4^{-}CD8^{+}$ ($CD8$ SP), 및 이중 양성 $CD4^{+}CD8^{+}$ (DP) 흉선세포의 백분율. C: 항-CCR8-mIgG2a mAb 및 이소형 대조군을 사용한 처리 후 비장, 혈액, 종양 및 피부에서의 $FOXP3^{+}$ Treg의 백분율. D: 항-CCR8-mIgG2a 및 이소형 대조군을 사용한 처리 후 흉선에서의 DP, $CD8$ SP, $CD4$ SP 및 DN 흉선세포의 백분율. E: 항-CCR8-mIgG2a 및 이소형 대조군을 사용한 처리 후 피부에서의 $CD4^{+}$ T 세포의 백분율. F: 항-CCR8-mIgG2a 및 이소형 대조군을 사용한 처리 후 피부에서의 $CD8^{+}$ T 세포의 백분율.

도 23A 및 23B는 항-CCR8이 마우스 모델에서 MC38 결장암의 성장을 억제함을 보여준다. A: 항-CCR8-mIgG2a를 사용한 MC38 결장암의 치료는 종양 성장을 유의하게 감소시켰고, 무종양 마우스의 수를 증가시켰다. B: 평균 종양 부피의 변화.

도 24A-24D는 항-mCCR8 Ab-유도된 Treg 고갈이 MC38 결장암 마우스 모델에서 강력한 단일 작용제 효능 및 증가된 약역학적 및 약동학적 반응으로 이어짐을 보여준다. A: 항-mCCR8 mAb의 단일 용량은 종양 부피의 용량-의존성 감소, Treg (% $FOXP3^{+}CD4^{+}$) 고갈 (B), 및 종양-침윤 $CD8^{+}$ T 세포의 백분율의 증가 (C)로 이어진다. 오차 막대는 평균의 표준 편차를 나타낸다. D: 항-mCCR8 mAb는 0.03 내지 3 mg/kg의 투여 범위에서 비-선형 PK를 나타낸다.

도 25A-25C는 MB49 무린 방광암 모델에서 종양 부피 상의 변화에 의해 측정된 바와 같이 항-PD-1 또는 항-CCR8 Ab 요법 단독과 비교하여 마우스 항-mPD-1 Ab와 마우스 항-mCCR8 Ab의 조합물의 종양 성장에 대한 효과를 보여준다. A: 항-CCR8-mIgG2a 및 항-PD-1은 각각 중간 및 낮은 수준의 종양 성장 억제를 유도하지만, 조합하여 종양 성장을 완전히 억제하는 데 있어서 상승작용적 효능을 입증한다. B: 항-PD-1의 존재 또는 부재 하에서의 항-CCR8-mIgG2a를 사용한 처리는 종양 Treg 빈도를 유의하게 감소시켰으나, 항종양 $CD8^{+}$ T 세포 빈도는 증가시켰다 (C).

도 26은 4T1 무린 유방암 모델에서 종양 부피 상의 변화에 의해 측정된 바와 같이 항-PD-1 또는 항-CCR8 Ab 요법 단독과 비교하여 마우스 항-mPD-1 Ab와 마우스 항-mCCR8 Ab의 조합물의 종양 성장에 대한 효과를 보여준다. 항-PD-1은 종양 성장을 억제하는 데 있어서 활성을 나타내지 않으며, 종양 성장은 음성 대조군 Ab의 조합물로 처리된 마우스에서의 활성을 밀접하게 반영하는 반면, 항-CCR8-mIgG2a는 중간 수준의 종양 성장 억제를 유도한다. 항-CCR8은 항-PD-1과 상승작용적으로 상호작용하여 종양 성장을 거의 완전히 억제한다.

도 27A 및 27B는 불활성 Fc 불변 영역을 포함하는 항-mCCR8 Ab가 SAIN 섬유육종 마우스 모델에서 항종양 활성을 나타낸다는 것을 보여준다. A: 항-CCR8-mIgG2a 처리는 이식후 제25일까지 종양 성장을 강력하게 감소시켰으며, 9마리의 마우스 모두는 무종양이었다. Fc-불활성 Ab (항-CCR8-mIgG1-D265A)를 사용한 CCR8의 차단은 종양 성장

을 부분적으로 감소시켰다. B: 항-CCR8로의 처리에 의한 종양 Treg의 고갈은 항-CCR8-mIgG2a 처리로 달성되었지만, Fc-불활성 항-CCR8-mIgG1-D265A로는 달성되지 않았다.

도 28A-28F는 MC38 종양 모델에서 항-mCCR8 Ab 활성화에 Fc 수용체 결속이 요구됨을 보여준다. 200 µg/마우스/처리로 종양 이식 후 제7일, 제10일 및 제14일에 항-CCR8-mIgG2a (n=10) (B), 항-CCR8-mIgG1-D265A (n=10) (C) 또는 IgG2a 이소형 대조군 (n=10) (D)으로 처리된 C57BL/6 마우스에 이식된 MC38 종양의 평균 (A) 및 개별 성장 곡선. E: MC38 종양을 이식 후 제15일에 수거하고, Treg 고갈을 유동 세포측정법에 의해 평가하였다 (군당 n=5) **P<0.01. 던 다중 비교를 사용한 일원 ANOVA 크루스칼-왈리스 검정. F: MC38 종양 이식 13일 후의 MC38 종양 및 말초 조직에서의 Ccr8^{+/+} 및 Ccr8^{-/-} 공여자-유래 Treg의 비율. **P<0.01. 이원 ANOVA에 이어서 본페로니 다중 비교 검정.

도 29A-29I는 항-CCR8-mIgG2a가 이중성 리첼린지 모델에서 생산적 기억 반응을 유도한다는 것을 보여준다. CT26 종양이 이식된 마우스를 종양이 100-120 mm³에 도달하였을 때 무작위화하였다. A-C: 0.2 mg/마우스/처리로 무작위화 후 1, 4, 및 8일에 (A) 항-CCR8-mIgG2a (n=8), (B) 항-CTLA4-mIgG2a (n=8) 또는 (C) mIgG2a 이소형 대조군 (n=8)으로 처리된 CT26 종양에서의 성장 곡선 및 Treg 고갈. 각각의 군으로부터의 6종의 종양을 유동 세포측정법에 의해 분석하여 무작위화 후 제9일에 Treg 고갈 (D) 및 AH1-사랑체⁺ CD8⁺ T 세포의 빈도 (E)를 평가하였다. F: 처리 92일 후의 혈액 중 AH1-사랑체⁺ CD8⁺ T 세포의 빈도. G: LM-AH1A5로의 첼린지 5일 후 혈액 중 AH1-사랑체⁺ CD8⁺ 이펙터 기억 T 세포 (TEM)의 빈도. H 및 I: 5시간 동안 AH1A5 펩티드로의 자극 후 비장에서의 (H) IFN γ ⁺ 및 (I) 다기능성 IFN γ ⁺ TNF α ⁺ CD8⁺ T 세포에 대한 세포내 시토카인 염색. ns, 유의하지 않음; *P<0.05, **P<0.01. 던 다중 비교를 사용한 일원 ANOVA 크루스칼-왈리스 검정 (D-I).

도 30A 및 30B는 다중 인간 암에서의 CCR8의 가변적 발현을 보여준다. 면역조직화학 (IHC)을 2 세트의 샘플 (전체-크기 조직 절편 및 MTB 세트)로부터의 17종의 암 유형/하위유형에서 수행하였다. A: 종양 유형당 14-24개의 샘플을 갖는 6종의 종양 유형/하위유형의 포르말린-고정 파라핀-포매 (FFPE) 슬라이드에서의 CCR8⁺ 세포의 전체-슬라이드 영상 분석을 보여주는 전체-크기 조직 절편. B: 20건의 사례/종양 유형을 갖는 16종의 종양 유형/하위유형을 보여주는 다중-종양 블록 (MTB) 세트. 각각의 MTB는 FFPE 블록당 단일 적응증의 5건의 사례 및 양성 대조군으로서 1개의 과형성 편도 샘플을 함유하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063]

발명의 상세한 설명

[0064]

본 발명은 세포 표면 상에 발현된 CCR8에 고친화도로 특이적으로 결합하는 mAb, 및 대상체에게 항-CCR8 Ab를 단독요법으로서 또는 항암제, 예컨대 면역 체크포인트 억제제, 화학요법제 및/또는 방사선 요법과 조합하여 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 종양 성장을 강력하게 억제하는 데 있어서 CCR8-매개 Treg 고갈 단독 및 PD-1 차단과 조합한 것의 효과는 본원에서 다수의 다양한 전임상 마우스 종양 모델에서 입증된다.

[0065]

용어

[0066]

본 개시내용이 보다 용이하게 이해될 수 있도록, 특정 용어가 먼저 정의된다. 본원에 달리 명백하게 제공된 경우를 제외하고는, 본 출원에 사용된 각각의 하기 용어는 하기 제시된 의미를 가질 것이다. 추가의 정의는 본 출원 전반에 걸쳐 제시된다.

[0067]

"투여하는", "투여하다" 또는 "투여"는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법 및 전달 시스템 중 임의의 것을 사용하여, 치료제를 포함하는 조성물을 대상체에게 물리적으로 도입하는 것을 지칭한다. 치료적 Ab, 예컨대 항-CCR8 및 항-PD-1 Ab의 투여에 바람직한 경로는 정맥내 (IV) 투여이다. 다른 투여 경로는 피하 (SC), 복강내 (IP), 근육내 (IM), 척수 또는 다른 비경구 투여 경로, 예를 들어 주사 또는 주입에 의한 것을 포함한다. 본원에 사용된 어구 "비경구 투여"는 통상적으로 주사에 의한, 경장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하고, 비제한적으로, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 림프내, 병변내, 피막내, 안와내, 심장내, 폐내, 경기관, 피하, 각피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입, 뿐만 아니라 생체내 전기천공을 포함한다. 대안적으로, 본 발명의 Ab는 비-비경구 경로, 예컨대 국소, 표피 또는 점막 투여 경로를 통해, 예를 들어 비강내, 경구, 질, 직장, 설하 또는 국소 투여될 수 있다. 또한, 투여는, 예

를 들어 1회, 복수회, 및/또는 1회 이상의 연장된 기간에 걸쳐 수행될 수 있다.

[0068] "항체" (Ab)는, 비제한적으로, 항원에 특이적으로 결합하고, 디설피드 결합에 의해 서로 연결된 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질 이뮤노글로불린 (Ig), 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하여야 한다. 각각의 H쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 V_H 로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. IgG Ab의 중쇄 불변 영역은 3개의 불변 도메인, C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 V_L 로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. IgG Ab의 경쇄 불변 영역은 1개의 불변 도메인 C_L 을 포함한다. V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 명명되는 보다 보존된 영역이 사이에 배치된, 상보성 결정 영역 (CDR)으로 명명되는 초가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 는 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 하기 순서: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4로 배열된, 3개의 CDR 및 4개의 FR을 포함한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 카바트, 코티아, AbM, 접촉, 및 IMGT 정의를 비롯한 다양한 방법이 Ab 내의 CDR 도메인을 상술하는 데 사용되어 왔다. Ab의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포 (예를 들어, 이펙터 세포) 및 고전적 보체계의 제1 구성요소 (C1q)를 비롯한, 숙주 조직 또는 인자에의 Ig의 결합을 매개할 수 있다.

[0069] 본원에 사용된 바와 같이, 통상적인 해석에 따라, "한" 중쇄 및/또는 "한" 경쇄를 포함하는 것으로 기재된 Ab는 "적어도 1개"의 언급된 중쇄 및/또는 경쇄를 포함하는 Ab를 의미하고, 따라서 2개 이상의 중쇄 및/또는 경쇄를 갖는 Ab를 포괄할 것이다. 구체적으로, 이와 같이 기재된 Ab는 2개의 실질적으로 동일한 중쇄 및 2개의 실질적으로 동일한 경쇄를 갖는 통상적인 Ab를 포괄할 것이다. Ab쇄는, 예를 들어 리신 잔기의 C-말단 절단, 및 대안적 글리코실화 패턴을 포함한 번역후 변형으로 인해 상이한 경우에 실질적으로 동일하지만 완전히 동일하지는 않을 수 있다.

[0070] Ig는 IgA, 분비형 IgA, IgG 및 IgM을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 일반적으로 공지된 이소형으로부터 유래할 수 있다. 또한 IgG 하위부류는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 알려져 있고, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 Ab 부류 또는 하위부류 (예를 들어, IgM, IgG1, 또는 IgG4)를 지칭한다. 용어 "항체"는, 예로서, 자연적으로 발생된 Ab 및 비-자연적으로 발생된 Ab 둘 다, 모노클로날 및 폴리클로날 Ab, 키메라 및 인간화 Ab, 인간 또는 비인간 Ab, 전체 합성 Ab, 및 단일쇄 Ab를 포함한다. 비인간 Ab는 인간에서 그의 면역원성을 감소시키기 위해 재조합 방법에 의해서 부분적으로 또는 전체적으로 인간화될 수 있다. 달리 명백하게 언급되지 않는 경우, 및 문맥상 달리 나타내지 않는 한, 용어 "항체"는 또한 상기 언급된 Ig 중 임의의 것의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 부분을 포함하고, 1가 및 2가 단편 또는 일부, 및 단일쇄 Ab를 포함한다.

[0071] "단리된" Ab는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 Ab가 실질적으로 없는 Ab를 지칭한다 (예를 들어, CCR8에 특이적으로 결합하는 단리된 Ab에는 CCR8 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 Ab, 예컨대 CCR4에 결합하는 Ab가 실질적으로 없다). 그러나, 인간 CCR8 (hCCR8)에 특이적으로 결합하는 단리된 Ab는 다른 항원 예컨대 상이한 종 예컨대 마우스 및 시노몰구스 원숭이로부터의 CCR8 폴리펩티드에 대하여 교차-반응성을 가질 수 있다. 더욱이, 특정 맥락에서, 단리된 Ab는 또한 실질적으로 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 없도록 정제된 Ab를 의미할 수 있다. 비교하자면, "단리된" 핵산은 자연계에 존재하는 바와 같은 핵산과 현저하게 상이한, 즉 독특한 화학적 정제, 성질 및 용용성을 갖는 물질의 핵산 조성물을 지칭한다. 예를 들어, 단리된 DNA는 천연 DNA와는 달리, 천연 DNA의 독립적 부분이고, 자연계에서 발견된 염색체인, 보다 큰 구조적 복합체의 내재성 부분이 아니다. 추가로, 천연 DNA와 달리, 단리된 DNA는 특히, 질환을 진단하거나 또는 치료제의 효능을 예측하기 위해 유전자 발현을 측정하고 바이오마커 유전자 또는 돌연변이를 검출하기 위한 PCR 프라이머 또는 혼성화 프로브로서 사용될 수 있다. 또한, 특정 문맥에서, 단리된 핵산은 관련 기술분야에 널리 공지된 표준 기술을 사용하여 다른 세포 성분 또는 다른 오염물, 예를 들어 다른 세포 핵산 또는 단백질이 실질적으로 없도록 정제된 핵산을 의미할 수 있다.

[0072] 용어 "모노클로날" Ab (mAb)는 단일 분자 조성으로 이루어진 Ab 분자, 즉, 그의 1차 서열이 본질적으로 동일하며, 특정한 에피토프에 대하여 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타내는 것인 Ab 분자로 이루어진 비-자연적으로 발생된 제제를 지칭한다. mAb는 단리된 Ab의 예이다. mAb는 하이브리도마, 재조합, 트랜스제닉, 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 기술에 의해 생산될 수 있다.

[0073] "키메라" Ab는, 가변 영역은 한 종으로부터 유래되고 불변 영역은 또 다른 종으로부터 유래된 것인 Ab, 예컨대 가변 영역은 마우스 Ab로부터 유래되고 불변 영역은 인간 Ab로부터 유래된 것인 Ab를 지칭한다.

- [0074] "인간" mAb (HuMAb)는 프레임워크 및 CDR 영역 둘 다가 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역을 갖는 mAb를 지칭한다. 추가로, Ab가 불변 영역을 함유하는 경우, 불변 영역은 또한 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 것이다. 본 발명의 인간 Ab는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해, 또는 생체내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "인간" Ab는 또 다른 포유동물 중, 예컨대 마우스의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 이식된 것인 Ab를 포함하는 것으로 의도되지 않는다. 용어 "인간" Ab 및 "완전 인간" Ab는 동의어로 사용된다.
- [0075] "인간화" mAb는 비-인간 mAb의 CDR 도메인 밖의 아미노산 중 일부, 대부분 또는 모두가 인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 상응하는 아미노산으로 대체된 mAb를 지칭한다. 인간화 형태의 Ab에 대한 한 실시양태에서, CDR 도메인 외부의 아미노산 중 일부, 대부분 또는 모두는 인간 이뮤노글로불린으로부터의 아미노산으로 대체된 반면, 1개 이상의 CDR 영역 내의 일부, 대부분 또는 모든 아미노산은 바뀌지 않는다. 아미노산의 소규모 부가, 결실, 삽입, 치환 또는 변형은 이들이 특정한 항원에 결합하는 Ab의 능력을 없애지 않는 한 허용가능하다. "인간화" Ab는 원래 Ab의 것과 유사한 항원 특이성을 유지한다.
- [0076] "항-항원" Ab는 항원에 특이적으로 결합하는 Ab를 지칭한다. 예를 들어, 항-CCR8 Ab는 CCR8에 특이적으로 결합하는 Ab인 반면, 항-PD-1 Ab는 PD-1에 특이적으로 결합하는 Ab이다. 본원에 사용된 "항-PD-1/항-PD-L1" Ab는 PD-1/PD-L1 신호전달 경로를 방해하는 데 사용되는 Ab이고, 이는 항-PD-1 Ab 또는 항-PD-L1 Ab일 수 있다.
- [0077] Ab의 "항원-결합 부분" 또는 "항원-결합 단편"은 전체 Ab에 의해 결합된 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 Ab, 예를 들어 mAb의 1개 이상의 단편을 지칭한다.
- [0078] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" ("ADCC")은 이펙터 세포 표면 상에 Fc 수용체 (FcR)를 발현하는 비특이적 이펙터 세포 (예를 들어, 자연 킬러 (NK) 세포, 대식세포, 호중구 및 호산구)가 표적 세포 상의 표면 항원에 결합된 Ab의 Fc 영역을 인식하고 표적 세포를 활발하게 용해시키는 시험관내 또는 생체내 세포-매개 세포독성 활성을 지칭한다. 원칙적으로, 활성화 FcR을 갖는 임의의 이펙터 세포는 ADCC를 매개하도록 촉발될 수 있다. 인간 대상체에 사용하기 위한 본 발명의 치료적 Ab는 바람직하게는 CCR8을 발현하는 세포에 대한 증진된 ADCC 활성을 매개하도록 특이적으로 변형된 항-hCCR8 Ab이다. Ab의 ADCC 활성은, 예를 들어 실시예 17-20 중 임의의 것에 기재된 바와 같이 측정될 수 있다.
- [0079] 본 발명의 변형된 Ab의 "증진된 ADCC" 또는 "증진된 ADCC 활성"은 변형되지 않은 Ab에 의해 유도된 ADCC보다 더 큰 ADCC 활성 수준을 지칭한다. 증진된 ADCC를 나타내는 본 발명의 변형된 항-CCR8 IgG1 Ab는, 예를 들어 그의 천연 IgG1 불변 도메인을 갖는 Ab보다 더 큰 ADCC를 유도하는 Ab의 변형된 형태이다. 비푸코실화 (nf) mAb는 활성화 Fc γ RIIIA에 대한 IgG의 개선된 결합을 통해 ADCC를 증진시키는 것을 유도하는 변형된 Ab의 예이다. 특정 실시양태에서, ADCC 활성의 증진 수준은, 예를 들어 NK 세포 용해 검정, 예를 들어 실시예 17에 기재된 NK 세포 용해 검정에서 세포 용해에 대한 EC₅₀의 감소에 의해 측정시, EC₅₀의 적어도 2배, 바람직하게는 적어도 10배, 보다 바람직하게는 적어도 100배 감소이다.
- [0080] "암"은 신체 내 비정상 세포의 비제어된 성장을 특징으로 하는 다양한 질환의 광범위한 군을 지칭한다. 비조절된 세포 분열 및 성장은 이웃 조직을 침습하는 악성 종양의 형성을 발생시키고, 또한 림프계 또는 혈류를 통해 신체의 원위 부분으로 전이될 수 있다.
- [0081] "C-C motifs 케모카인 수용체 8" ("CCR8"; 또한 관련 기술분야에 예를 들어 CY6, TER1, CCR-8, CKRL1, CDw198, CMKBR8, GPRCY6, CMKBRL2, 또는 CC-CKR-8로도 공지됨)은 7-막횡단 GPCR이고; 이 GPCR은 주로 종양내 FOXP3^{hi} Treg 상에서 발현되는 것으로 나타났다. 본원에 사용된 용어 "CCR8"은 인간 CCR8 (hCCR8), 변이체, 이소형, hCCR8의 중 상동체, 예컨대 마우스 CCR8 (mCCR8), 및 hCCR8과 적어도 하나의 공통 에피토프를 갖는 유사체를 포함한다. 완전한 hCCR8 및 mCCR8 아미노산 서열은 각각 진뱅크® 수탁 번호 AAI07160.1 및 NP_031746.1 하에 찾아볼 수 있다.
- [0082] "세포 표면 수용체"는 신호를 수신하고 세포의 형질 막을 가로질러 신호를 전달할 수 있는, 세포의 표면 상에 발현된 분자 또는 분자의 복합체를 지칭한다.
- [0083] "이펙터 기능"은 Ab Fc 영역과 FcR 또는 리간드의 상호작용, 또는 그로부터 발생하는 생화학적 사건을 지칭한다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합, 보체 의존성 세포독성 (CDC), FcR 결합, Fc γ R 매개 이펙터 기능 예컨대 ADCC 및 Ab 의존성 세포 매개 식세포작용 (ADCP), 및 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체;

BCR)의 하향-조절을 포함한다. 이러한 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, Ab 가변 도메인)과 조합될 것을 요구한다.

[0084] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 이뮤노글로불린의 Fc 영역에 결합하는 수용체이다. IgG Ab에 결합하는 FcR은 이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함한, Fc γ R 패밀리의 수용체를 포함한다. Fc γ R 패밀리는 3종의 활성화 수용체 (마우스에서 Fc γ RI, Fc γ RIII, 및 Fc γ RIV; 인간에서 Fc γ RIA, Fc γ RIIA, 및 Fc γ RIIA) 및 1종의 억제 수용체 (Fc γ RIIB)로 이루어진다. 인간 Fc γ R의 다양한 특성이 표 1에 요약되어 있다. 대다수의 선천성 이펙터 세포 유형은 1종 이상의 활성화 Fc γ R 및 억제 Fc γ RIIB를 공동-발현하는 반면에, NK 세포는 1종의 활성화 Fc 수용체 (마우스에서 Fc γ RIII 및 인간에서 Fc γ RIIA)를 선택적으로 발현하지만, 마우스 및 인간에서 억제 Fc γ RIIB는 발현하지 않는다.

[0085] 표 1. 인간 Fc γ R의 특성

Fc γ	대립유전자 변이체	인간 IgG에 대한 친화도	이소형 선호도	세포 분포
Fc γ RI	기재된 것 없음	높음 (K _D ~10 nM)	IgG1=3>4>>2	단핵구, 대식세포, 활성화된 호중구, 수지상 세포?
Fc γ RIIA	H131	낮음에서 보통	IgG1>3>2>4	호중구, 단핵구, 대식세포, 호산구, 수지상 세포, 혈소판
	R131	낮음	IgG1>3>4>2	
Fc γ RIIA	V158	보통	IgG1=3>>4>2	NK 세포, 단핵구, 대식세포, 비만 세포, 호산구, 수지상 세포?
	F158	낮음	IgG1=3>>4>2	
Fc γ RIIB	I232	낮음	IgG1=3=4>2	B 세포, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 비만 세포
	T232	낮음	IgG1=3=4>2	

[0086]

[0087] "Fc 영역" (결정화가능 단편 영역), "Fc 도메인" 또는 "Fc"는, 면역계의 다양한 세포 (예를 들어, 이펙터 세포) 상에 위치하는 FcR 또는 전형적 보체계의 제1 성분 (C1q)에 대한 결합을 포함한, Ig의 숙주 조직 또는 인자에 대한 결합을 매개하는 Ab의 중쇄의 C-말단 영역을 지칭한다. 따라서, Fc 영역은 제1 불변 영역 Ig 도메인을 제외한 Ab의 불변 영역을 포함하는 폴리펩티드이다. IgG, IgA 및 IgD Ab 이소형에서, Fc 영역은 Ab의 2개의 중쇄의 제2 (C_{H2}) 및 제3 (C_{H3}) 불변 도메인으로부터 유래된 2개의 동일한 단백질 단편으로 구성되고; IgM 및 IgE Fc 영역은 각각의 폴리펩티드 쇠에 3개의 중쇄 불변 도메인 (C_H 도메인 2-4)을 함유한다. IgG의 경우에, Fc 영역은 Ig 도메인 C γ 2 및 C γ 3, 및 C γ 1과 C γ 2 사이의 힌지를 포함한다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상적으로 위치 C226 또는 P230의 아미노산 잔기에서부터 중쇄의 C-말단까지 이어지는 것으로 정의되며, 여기서 넘버링은 카바트(Kabat)에서와 같은 EU 인덱스에 따른다. 인간 IgG Fc 영역의 C_{H2} 도메인은 약 아미노산 231에서 약 아미노산 340까지 이르는 반면, C_{H3} 도메인은 Fc 영역에서 C_{H2} 도메인의 C-말단 측에 위치하며, 즉 이는 IgG의 약 아미노산 341에서 약 아미노산 447까지 이어진다. 본원에 사용된 Fc 영역은 천연 서열 Fc 또는 변이체 Fc일 수 있다.

[0088] 본원에 사용된 "푸코실화" 및 "비푸코실화"는 각각 Ab의 위치 N297에서 N-연결된 글리칸 상의 코어 푸코스 잔기의 존재 및 부재를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 또는 문맥으로부터 명백하지 않는 한, Ab의 Fc 영역 내의 아미노산 잔기 넘버링은 EU 넘버링 규정에 따른다 (문헌 [Kabat et al., 1991]에서와 같은 EU 인덱스).

[0089] "면역 반응"은 외래 작용제에 대한 척추동물 내에서의 생물학적 반응을 지칭하며, 반응은 이들 작용제 및 그에 의해 유발되는 질환에 대해 유기체를 보호한다. 면역 반응은 침입 병원체, 병원체로 감염된 세포 또는 조직, 암성 또는 다른 비정상 세포, 또는 자가면역 또는 병리학적 염증의 경우에 정상 인간 세포 또는 조직의 선택적 표적화, 그에 대한 결합, 그에 대한 손상, 그의 파괴 및/또는 그의 척추동물 신체로부터의 제거를 유발하는, 면역계의 세포 (예를 들어, T 림프구, B 림프구, NK 세포, 대식세포, 호산구, 비만 세포, 수지상 세포 또는 호중구) 및 이들 세포 중 임의의 것 또는 간에 의해 생산된 가용성 거대분자 (Ab, 시토카인 및 보체 포함)의 작용에 의해 매개된다.

[0090] 용어 "면역요법"은 면역 반응을 유도하거나, 증진시키거나, 억제하거나 또는 다르게는 변형시키는 것을 포함하

는 방법에 의한, 질환을 앓고 있거나 또는 질환에 걸릴 위험이 있거나 또는 질환의 재발로 인해 고통받을 위험이 있는 대상체의 치료를 지칭한다.

- [0091] 용어 "단독요법"은 단일 유형의 치료, 예컨대 예를 들어 환자에게 단일 약물의 투여, 또는 질환 또는 상태를 치료하기 위한 방사선 요법 또는 수술 단독의 사용을 지칭한다. 동일한 치료 과정에서 질환 또는 상태에 대한 또 다른 유형의 치료, 예컨대 추가의 약물의 투여가 선행되거나 후속되는 경우에, 약물 단독의 투여는 단독요법으로 여겨지지 않는다.
- [0092] 대조적으로, "조합 요법"은 적어도 2가지 유형의 요법을 조합한 치료 양식, 예컨대 예를 들어 질환 또는 상태를 치료하기 위해 환자에게 2종 이상의 약물을 투여하는 것, 또는 약물 플러스 방사선 요법 또는 수술을 투여하는 것을 지칭한다. 이들 2종 이상의 치료는 환자에게 공동으로 전달될 필요는 없지만, 동일한 치료 과정의 일부이다. 특정 실시양태에서, 상이한 요법은 동시에 투여된다. 다른 실시양태에서, 한 요법의 투여는 적어도 하나의 다른 요법의 투여와 중첩된다. 추가 실시양태에서, 상이한 요법은 순차적으로 투여된다.
- [0093] "면역 반응을 강화시키는 것"은 대상체에서 기존 또는 유도된 면역 반응일 수 있는 면역 반응의 유효성 또는 효력을 증가시키는 것을 의미한다. 유효성 및 효력의 이러한 증가는, 예를 들어 내인성 숙주 면역 반응을 억제하는 메커니즘을 감소시키거나 극복함으로써, 내인성 숙주 면역 반응을 증진시키는 메커니즘을 자극함으로써, 또는 면역요법제에 의해 도출되는 면역 반응을 증진시킴으로써 달성될 수 있다.
- [0094] "프로그래밍된 사멸-1" (PD-1)은 주로 생체내에서 앞서 활성화된 T 세포 상에서 발현되고, 2개의 리간드 PD-L1 및 PD-L2에 결합하는, CD28 패밀리에 속하는 면역억제성 수용체를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "PD-1"은 인간 PD-1 (hPD-1), hPD-1의 변이체, 이소형 및 중 상동체, 및 hPD-1과 적어도 하나의 공통 에피토프를 갖는 유사체를 포함한다. 완전한 hPD-1 아미노산 서열은 진뱅크® 수탁 번호 U64863 하에 찾을 수 있다.
- [0095] "프로그래밍된 사멸 리간드-1" (PD-L1)은 PD-1에 결합 시 T 세포 활성화 및 시토카인 분비를 하향조절하는, PD-1에 대한 2종의 세포 표면 당단백질 리간드 중 하나이다 (다른 것은 PD-L2임). 본원에 사용된 용어 "PD-L1"은 인간 PD-L1 (hPD-L1), hPD-L1의 변이체, 이소형 및 중 상동체, 및 hPD-L1과 적어도 하나의 공통 에피토프를 갖는 유사체를 포함한다. 완전한 hPD-L1 서열은 진뱅크® 수탁 번호 Q9NZQ7 하에 찾을 수 있다.
- [0096] "대상체"는 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. 용어 "비인간 동물"은 척추동물, 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 및 설치류, 예컨대 마우스, 래트 및 기니 피그를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 용어 "대상체" 및 "환자"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.
- [0097] 약물 또는 치료제의 "치료 유효량" 또는 "치료 유효 투여량"은 단독으로 또는 또 다른 치료제와 조합하여 사용되었을 때, 대상체를 질환 발병으로부터 보호하거나, 또는 대상체에서 질환 증상의 중증도 감소, 질환 무증상 기간의 빈도 및 지속기간의 증가, 질환 고통으로 인한 손상 또는 장애의 예방 또는 감소, 또는 다르게는 질환 증상의 호전에 의해 입증되는 질환 퇴행을 촉진시키는 약물 또는 작용제의 임의의 양이다. 추가로, 치료와 관련한 용어 "유효한" 및 "유효성"은 약리학적 유효성 및 생리학적 안전성 둘 다를 포함한다. 약리학적 유효성은 약물이 환자에서 질환 퇴행, 예를 들어, 암 퇴행을 촉진시킬 수 있는 능력을 지칭한다. 생리학적 안전성은 허용되는 수준의 독성, 또는 약물의 투여로부터 초래되는 세포, 기관 및/또는 유기체 수준에서 다른 유해한 생리학적 효과 (부작용)를 지칭한다. 치료제의 효능은 숙련된 진료의에게 공지된 다양한 방법을 사용하여, 예컨대, 임상 시험 동안 인간 대상체에서, 인간에서의 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서, 또는 시험관내 검증법에서 작용제의 활성을 검증함으로써 평가될 수 있다.
- [0098] 종양의 치료에 대한 예로서, 치료 유효량의 항암제는 세포 성장 또는 종양 성장을, 비치료 대상체에 비해 바람직하게는, 적어도 약 20%, 바람직하게는 적어도 약 40%, 보다 바람직하게는 적어도 약 60%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 80%, 보다 더 바람직하게는 약 100% 억제한다. 종양 성장을 억제하는 작용제 또는 치료의 능력은 동물 모델 시스템, 예컨대 CT26 결장 선암종, MC38 결장 선암종, SA1N 섬유육종, 4T1 유방 암종 및 MB49 방광 암종 마우스 종양 모델 중 임의의 것에서 평가될 수 있으며, 이는 인간 종양에서의 효능을 예측한다. 대안적으로, 종양 성장 억제는 숙련된 진료의에게 공지된 검정을 사용하여 시험관내에서 세포 성장을 억제하는 작용제 또는 치료의 능력을 평가함으로써 측정될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 종양 퇴행은 인간 대상체에서 적어도 약 30일, 보다 바람직하게는 적어도 약 60일, 또는 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 6개월의 기간 동안 관찰되고, 계속 진행될 수 있다.
- [0099] 약물의 치료 유효량은, 질환 발생 위험이 있는 대상체 (예를 들어, 암 발생 위험이 있는, 전암성 상태를 갖는 대상체), 또는 질환 재발을 앓을 위험이 있는 대상체에게 단독으로 또는 또 다른 치료제와 조합하여 투여하였을

때, 질환 (예를 들어, 암)의 발생 또는 재발을 억제하는 약물의 임의의 양인 "예방 유효량"을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 예방 유효량은 질환의 발생 또는 재발을 전적으로 방지한다. 질환의 발생 또는 재발을 "억제하는 것"은 질환의 발생 또는 재발의 가능성을 감소시키거나, 또는 질환의 발생 또는 재발을 전적으로 방지하는 것을 의미한다.

- [0100] 대상체의 "치료" 또는 "요법"은 질환과 연관된 증상, 합병증, 또는 상태, 또는 생화학적 징후의 발병, 진행, 발생, 중증도 또는 재발을 역전, 경감, 호전, 억제, 저속화 또는 예방하기 위한 목적으로 대상체에게 수행되는, 활성제 투여를 비롯한, 임의의 유형의 개입 또는 프로세스를 지칭한다.
- [0101] 본원에 사용된 단수 형태는 임의의 언급되거나 열거된 성분 중 "하나 이상"을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0102] 용어 "약"은, 수치 값에 적용되는 경우에, 언급된 값에 합리적으로 근접하고 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정된 바와 같은 허용 오차 범위 내에 있는 값을 지칭하며, 이는 부분적으로 값이 어떻게 측정 또는 결정되는지, 즉 측정 시스템의 한계에 좌우될 것이다. 예를 들어, "약"은 언급된 참조 값의 플러스 또는 마이너스 50%의 범위, 바람직하게는 플러스 또는 마이너스 25%의 범위, 또는 보다 바람직하게는 플러스 또는 마이너스 10%의 범위를 의미할 수 있다. 특정한 값이 본 출원에 제공되는 경우에, "약"의 의미는, 달리 언급되지 않는 한, 관련 기술분야의 실시예에 따른 그 특정한 값에 대한 허용 오차 범위 내에 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0103] 용어 "실질적으로 동일한" 또는 "본질적으로 동일한"은 관련 기술분야의 통상의 기술자가 측정된 특성과 관련하여 2개 이상의 수치 값, 조성, 또는 특징 사이의 차이는 거의 없거나, 또는 생물학적 및/또는 통계적 유의성이 없다고 간주할 정도로, 이들 값, 조성, 또는 특징이 충분히 높은 정도로 유사하다는 것을 지칭한다. 측정된 수치 값 사이의 차이는, 예를 들어, 약 50% 미만, 바람직하게는, 약 25% 미만, 보다 바람직하게는, 약 10% 미만일 수 있다.
- [0104] 본원에 기재된 임의의 농도 범위, 백분율 범위, 비 범위 또는 정수 범위는 달리 나타내지 않는 한, 언급된 범위 내의 임의의 정수 값, 및 적절한 경우에, 그의 분율 (예컨대 정수의 1/10 및 1/100)을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0105] 본 발명의 다양한 측면이 하기 서브섹션에서 추가로 상세하게 기재된다.
- [0106] 특히 고도의 면역억제성 종양-침윤 Treg에서의 CCR8의 발현
- [0107] 본원에 보고된 다양한 실험은 CCR8이 인간 종양에서 Treg에 의해 특이적으로 발현되고, 현재 임상 시험이 진행되고 있는 Treg 고갈 표적인 CCR4와 달리, CCR8은 억제성 종양 Treg 상에서 선택적으로 발현되고 염증유발 Teff 상에서 최소로 발현된다는 것을 입증한다. 더 캔서 게놈 아틀라스(The Cancer Genome Atlas) (TCGA; 미국 국립암 연구소(National Cancer Institute), 2021)에서 인간 CCR8 및 FOXP3 유전자-유전자 상관관계의 분석 (실시예 1)은 CCR8 발현이 대부분의 암 유형에서 FOXP3 (Treg의 마스터 전사 조절인자)과 가장 높은 상관관계를 갖는다는 것을 보여주었다 (도 1A). CCR8은 종양 FOXP3^{hi} Treg 상에서 발현되지만, 말초 혈액에서 Treg 및 Teff 상에서 거의 관찰되지 않는다. CCR8은 또한 HCC 종양 샘플에서 FOXP3^{hi} 림프구 상에서 선택적으로 발현되지만, 환자 종양에서 FOXP3^{mid} 및 FOXP3^{neg} CD8 및 CD4 Teff에서는 그렇지 않다 (도 1B). CCR8 발현은 보다 높은 수준의 FOXP3 발현 및 Treg의 정규 마커 (IL2RA, IKZF2, BATF)와 연관된 반면, CCR8의 보다 낮은 발현은 세포독성 T 세포 마커 (GZMA, CD8A; 도 1C)와 연관된다.
- [0108] 상이한 Treg-연관 분자들의 발현 프로파일들을 비교하면 (실시예 3), CCR8이 환자-매칭 혈액으로부터의 Treg 상에서보다 종양-연관 FOXP3⁺ Treg 상에서 더 고도로 발현되는 것으로 나타난 반면, 종양 및 혈액으로부터의 Treg 상에서의 CCR4, CTLA-4 및 CD25의 발현에는 차이가 거의 없었다 (도 2A). 종양 및 말초 혈액 둘 모두에서 CD4⁺ Tconv (도 2C 및 D) 및 CD8⁺ T 세포 (도 2E 및 F) 상에서의 CCR8의 낮은 발현 빈도와 함께, 말초 혈액 Treg와 비교하여 FOXP3⁺ 종양 Treg 상에서의 CCR8의 높은 세포당 존재비 (도 2B)는 CCR8이 항종양 Teff 세포 집단을 손상시킬 위험이 낮은 종양 Treg를 표적화하기 위한 고도로 선택적인 치료 마커를 나타낸다는 것을 시사한다.
- [0109] 인간 종양과 연관된 T 림프구의 상이한 하위세트에서의 CCR8의 발현 수준의 유동 세포측정 분석 (실시예 4)은 CCR8이 FOXP3에 의해 정의된 바와 같이 높은 비율의 종양-상주 Treg (종양 82%)에 의해 발현된다는 것을 보여주었다 (도 3A). 대조적으로, 훨씬 더 낮은 비율의 종양-침윤 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포는 CCR8을 발현한다

(각각 중앙 12.65% 및 4.55%; 도 3B). 작은 비율의 CD4 Tconv 세포는 CCR8을 발현하는 반면, 세포당 기준으로 CCR8의 발현 수준은 CD4 Tconv 세포보다 Treg 상에서 유의하게 더 높으며 (중앙 MFI 2106 대 132, $P < 0.0001$), CD8⁺ T 세포는 무시할만한 수준의 CCR8을 발현한다 (도 3B). 말초 혈액 내의 Treg는 또한 CCR8을 발현하지만 중앙-침윤 Treg 상에서보다 유의하게 더 낮은 수준으로 발현하는 것으로 나타났다 (도 3C).

[0110] 상이한 인간 Treg 하위집단 상에서의 CCR8의 차등 발현을 또한 유동 세포측정법에 의해 분석하였다 (실시예 5). 건강한 대상체로부터의 PBMC에서, CCR8은 말초 혈액 Treg 상에서 주로 발현되지만, 중앙-침윤 Treg의 약 중앙 82%에서의 발현 (도 3a 참조)과 비교하여 이들 말초 Treg의 작은 분획 (중앙 21%)에서만 발현되는 것으로 밝혀졌다 (도 4A). 따라서, 항-CCR8 Ab-매개 세포 고갈은 말초 Treg 집단 내의 CCR8⁺ Treg의 낮은 비율로 인해 말초 Treg 구획에 유의하게 영향을 미치지 않을 것이다. 이는 비-중앙 연관 Treg의 무차별적인 고갈과 비교하여 CCR8을 표적화함으로써 중앙-연관 Treg를 고갈시키는 것과 연관된 자가면역 독성의 더 낮은 위험을 암시한다. Treg 집단 내에서, CCR8은 이펙터 기억 집단에서 보다 고도로 발현되고, 중심 기억 세포에서는 보다 적은 정도로 발현되며, 나이브 Treg (도 4B) 또는 통상적인 CD4⁺ T 세포 (도 4C)에서는 CCR8이 거의 발현되지 않는다. 암 환자에서, 결합된 항-CCR8 Ab의 MFI에 의해 측정된 바와 같이 말초 혈액으로부터의 Treg보다 중앙-침윤 Treg에 대해 세포당 기준으로 더 높은 CCR8 발현이 존재한다 (도 4D).

[0111] 임상에서의 다른 Treg-표적화 nf 작용제 (CCR4-모가몰리주맙 및 CTLA-4-Ipi-nf)와 비교하여, CCR8은 불량한 생존과 연관된 FOXP3^{hi} 중앙 Treg의 가장 활성화된 면역억제 하위세트 상에서 특이적으로 발현되며 (Plitas et al., 2016; Wang et al., 2019), 이는 그랜자임 및 다른 이펙터 시토카인을 발현하는 Teff를 효과적으로 배제한다. 2종의 흑색종 중앙 및 RCC 중앙을 해리시키고, FOXP3 및 CCR8 발현에 대해 염색하였다 (실시예 6). 도 5는 CCR8이 가장 면역억제성인 CD4⁺ FOXP3^{high} Treg 집단 (가장 활성화된 Treg를 나타냄) 상에서 발현됨을 보여준다. 명백한 FOXP3^{mid} 집단이 존재하는 흑색종 샘플에서, 대부분의 CCR8 발현은 FOXP3^{high} T 세포에서 발견되며, CCR8 발현의 수준은 주로 그랜자임 및 다른 이펙터 시토카인을 발현하는 이펙터 세포인 FOXP3^{mid} 및 FOXP3^{neg} 중앙 T 세포에서 유의하게 더 낮다. 대부분의 환자 FOXP3⁺ T 세포가 높은 수준의 FOXP3을 나타내는 RCC 샘플에서, CCR8 발현은 FOXP3 발현과 중첩된다. FOXP3^{mid} CD4⁺ T 세포와 대조적으로, FOXP3^{high} CD4⁺ T 세포가 진정한 Treg인 것으로 나타났으며, 이는 활성화된 통상적인 T 세포 또는 휴지기 Treg일 수 있다.

[0112] CCR8⁺ CCR8⁻ 중앙-침윤 T 세포 집단에서의 기능적으로 관련된 분자의 발현을 조사하였다 (실시예 7). 환자 중앙 샘플로부터의 CCR8⁺ 세포는 CD25, IL1R2 및 CD39와 같은 잠재적 면역억제 기능을 갖는 여러 단백질을 공동-발현하는 것으로 나타난 반면 (도 6A-D), CCR4⁺ T 세포에서는 대등한 풍부화가 나타나지 않았다 (도 7a-d). 활성화 마커로서 HLA-DR을 사용하여, CCR8 발현은 또한 보다 높은 수준의 HLA-DR 발현과 상관관계가 있고 (도 8A) 이에 의해 활성화된 Treg를 확인하지만, CCR4 발현은 그렇지 않다 (도 8B). 따라서, CCR8⁺ 세포의 고갈은 CD25, CD39 및 IL1R2를 발현하는 활성화된 면역억제 Treg를 제거할 것인 반면, 이들 분자를 발현하는 Treg는 CCR4-표적화된 고갈에 의해 제거되지 않을 것이다. 또한, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트 (PMA) 및 이오노마이신을 사용한 생체의 해리된 환자 중앙 세포의 자극은 CD4⁺ T 세포의 CCR8⁺ 분획에서 최소 IL-2, IFN γ 및 그랜자임 B 생산을 유도하였다 (도 9A-C). 대조적으로, CCR4⁺CD4⁺ T 세포는 IFN γ 및 IL-2의 주요 생산자였으며 (도 10A 및 B), 이는 CCR4⁺의 표적화된 고갈은 항중앙 면역에 유해할 수 있지만, CCR8⁺ 세포는 그렇지 않다는 것을 시사한다.

[0113] 실시예 1-7에서 밝혀지고 상기 요약된 데이터는 중앙 내 모든 CD4⁺FOXP3⁺ T 세포가 CCR8을 발현하는 것은 아니며, CCR8⁺ 분획이 FOXP3⁺ 세포의 보다 면역억제성인 하위세트를 나타내는 것으로 보인다는 것을 보여준다. 따라서, CCR8 발현은 중앙에서 풍부하고 항중앙 면역을 방해할 수 있는 고도로 억제성인 Treg의 하위세트를 표시한다. 중앙-특이적 Treg, 특히 가장 활성화되고 면역억제성인 CD4⁺ FOXP3^{high} 중앙내 Treg에 대한 CCR8 발현의 높은 특이성은 CCR8을 항-CCR8 Ab를 사용하여 ADCC를 통해 이들 고도로 면역억제성인 Treg의 고갈을 매개하기 위한 최적의 표적으로 만든다.

[0114] 따라서, 본원에 기재된 실험 (실시예 8)에서 항-hCCR8 mAb를 생성하였고, 암 치료를 위한 치료적 Ab에서 바람직

한 다중 성질을 나타내는 Ab를 확인하기 위해 스크리닝하였다 (실시예 9-31). 대용물 마우스 항-mCCR8-mIgG2a Ab가 다수의 마우스 종양 모델에서 종양 성장을 강력하게 억제하였고, 비푸코실화 (nf) 항-hCCR8 Ab가 항종양 면역 반응을 구동시키는 염증유발성 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ Teff 세포를 보존하면서 생체외 환자 종양 샘플 및 시험관내에서 인간 종양 Treg를 고갈시켰다는 것이 본원에서 입증된다 (실시예 20 및 22). 종양-연관 Treg의 고갈은 그의 면역억제 효과를 감소시키고, 이에 의해 암과 싸우는 데 있어서 전체 면역 반응을 증진시킨다. 또한, CCR8은 말초 혈액 또는 다른 조직에서 Treg 및 Teff 상에서 거의 발현되지 않기 때문에, Treg를 표적화하는 것은 최소의 독성 위험을 제기한다. 비교하면, 시험관내 항-hCCR4-IgG1-nf 처리는 말초 및 종양 미세환경에서 Treg 및 $CD4^{+}$ Tconv 세포 둘 다의 고갈을 유도하였다 (실시예 20 및 22). 이는 모가물리주맵 (항-CCR4)이 임상에서 말초 혈액에서 Teff 집단을 고갈시킨다는 증거와 일치한다 (Kurose et al., 2015).

[0115] 항-hCCR8 mAb의 생성

[0116] CCR8을 포함한 케모카인 수용체는 전통적으로 세포 표면 상의 그의 낮은 프로파일 및 Ab 결합에 대한 상대적 접근불가능성으로 인해 "Ab를 발생시키기 매우 어려운 항원"이었다 (WO 2007/044756). 또한, 케모카인 수용체의 세포외 도메인에 상응하는 펩티드에 대해 생성된 Ab는 아마도 2차 구조의 차이 때문에 세포 상의 무손상 수용체를 인식하지 못한다. 이들 어려움 때문에, 케모카인 수용체에 대한 Ab를 생성하기 위한 노력은 낮은 성공률을 가졌다 (WO 2007/044756). CCR8은 특히 어려운 GPCR이며, 이는 Ab를 생성하기 위한 "극도로 어려운" 표적으로서 기재되었다 (Harbour BioMed, 2020).

[0117] 마우스를 hCCR8-발현 세포로 면역화시킴으로써 항-hCCR8 Ab를 생성하기 위한 초기 노력은 성공적이지 않았다. 그러나, 다양한 hCCR8 항원 및 이들 항원의 다양한 조합으로 상이한 설치류의 면역화를 시도한 후 본 연구 (실시예 8)에서 항-hCCR8 mAb가 생성되었다.

[0118] 설치류의 면역화

[0119] 표준 C57B1/6 마우스, 인간 Ig 레퍼토리를 발현하는 상이한 계통의 트랜스제닉 마우스, 특이적으로 생성된 CCR8^{-/-} 녹아웃 마우스 계통, 래트 및 햄스터를 포함한 상이한 설치류를 hCCR8을 과다발현하는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO), 마우스 BAF3 및 인간 HEK 293F 세포, 또는 이들 세포로부터 정제된 형질 막을 포함한 다양한 hCCR8 항원을 포함하는 면역원으로 면역화시켜 인간화 또는 인간 항-CCR8 mAb를 생성하였다. 이들 면역원은 소 혈청 알부민 (BSA) 또는 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH)에 접합된, 위치 15 및/또는 17에 단일 또는 이중 황산화 티로신 잔기를 중요하게 함유하는 hCCR8 N-말단 (hCCR8의 잔기 1-35)으로부터 화학적으로 합성된 펩티드로 부스팅되었다. 비-트랜스제닉 마우스에서 생성된 특정 mAb를 후속적으로 인간화 또는 키메라 유도체로 변형시켰다.

[0120] 단백질은 종종 번역후 변형을 나타내며, 그 중 일부, 예를 들어 글리코실화는 매우 잘 연구되고 문서화되어 있다. 비교해 보면, 특정 세포외 티로신 잔기의 황산화는 거의 연구되지 않았고, 지금까지 황산화 티로신을 함유하는 것으로 문서화된 32개의 확인된 분자만이 존재한다 (Mehta et al., 2020). 황산화 티로신을 갖는 추가의 단백질이 아직 발견되지 않았지만, 황산화 티로신은 상당히 드문 것으로 추정된다 (Moore, 2003). 화학적 모이어티로서, 이들은 모든 다른 아미노산과 매우 상이하고, 따라서 매우 높은 특이성 및 낮은 오프-타겟 결합을 갖는 Ab를 생성하는 탁월한 초점을 나타낸다. CCR8을 포함하는 케모카인 수용체는 그의 N-말단 상에 황산화 티로신을 갖는 것으로 널리 문서화된 소수의 단백질 부류 중 하나를 구성한다 (Ludeman and Stone, 2014). 이들 수용체 중 몇몇에 대해, 티로신 황산화는 리간드, 즉 케모카인 결합에 결정적인 것으로 밝혀졌다 (Zhu et al., 2011). 따라서, 티로신 술페이트와 결합하는 Ab는 케모카인과 케모카인 수용체 사이의 결합을 방해하여 케모카인 수용체 활성화를 방지할 가능성이 있다. 본원의 다른 곳에 논의된 바와 같이, 서열 V₁₂T₁₃D₁₄Y₁₅Y₁₆Y₁₇P₁₈D₁₉I₂₀F₂₁S₂₂ (서열식별번호: 109)를 갖는 펩티드 내의 적어도 하나의 아미노산을 포함하는, 예를 들어 서열 V₁₂T₁₃D₁₄Y₁₅Y₁₆Y₁₇P₁₈D₁₉I₂₀F₂₁S₂₂ (서열식별번호: 109)를 갖는 펩티드 내의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 모든 아미노산을 포함하는 에피토프에 결합하는 본 발명의 Ab, 및 특히 여기서 아미노산 Y15 및 Y17은 황산화된 것이 특히 관심대상이고, 실시예 11은 mAb 4A19가 약 1.6 nM의 K_D로 이중 황산화 CCR8 N-말단에 결합한다는 것을 제시한다 (표 5 참조).

[0121] 항-CCR8 mAb의 감소된 푸코실화, 비푸코실화 및 저푸코실화

[0122] Ab와 FcγR의 상호작용은 N297 잔기 (EU 넘버링)에서 각각의 Fc 단편에 부착된 글리칸 모이어티를 변형시킴으로써 증진될 수 있다. 특히, 코어 푸코스 잔기의 부재는 항원 결합 또는 보체-의존성 세포독성 (CDC; 문헌 [Natsume et al., 2009])을 변경시키지 않으면서 활성화 FcγRIIIA에 대한 IgG의 개선된 결합을 통해 ADCC를

강하게 증진시킨다. 인간 Treg 상의 CCR8에의 nf Ab의 결합은 NK 세포 상의 FcγR 및 골수단핵구성 Teff의 결속을 용이하게 한다. 이러한 FcγR 결속은 NK 세포 활성화를 구동시켜 ADCC에 의한 Treg 사멸을 증진시킨다. 비-푸코실화 종양-특이적 Ab가 생체내 마우스 모델에서 증진된 치료 활성으로 해석된다는 설득력 있는 증거가 있다 (Nimmerjahn and Ravetch, 2005; Moessner et al., 2010).

[0123] Ab 글리코실화의 변형은, 예를 들어 변경된 글리코실화 기구를 갖는 숙주 세포에서 Ab를 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 본원에 개시된 특정 항-hCCR8 mAb는 감소 또는 제거된 푸코실화를 보유하고, 증진된 ADCC를 나타내며, 이는 본 발명의 방법에 특히 유용하다. 따라서, 본원에 개시된 항-hCCR8 mAb는, 예를 들어 변경된 글리코실화 기구를 갖는 세포에서 항-hCCR8 mAb를 발현시킴으로써 이들이 감소 또는 제거된 푸코실화를 보유하는 형태로 생성될 수 있고, 그 결과 본 발명의 방법에 특히 유용한 증진된 ADCC를 나타낸다. 변경된 글리코실화 기구를 갖는 세포는 관련 기술분야에 기재되어 있고, 본 개시내용의 제조할 Ab를 발현시켜 변경된 글리코실화를 갖는 Ab, 예를 들어 mAb를 생산하는 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포주 Ms704, Ms705 및 Ms709는 푸코실트랜스퍼라제 효소, FUT8 (α-(1,6) 푸코실트랜스퍼라제; 미국 공개 번호 2004/0110704; 문헌 [Yamane-Ohnuki et al., 2004] 참조)이 결여되어 있어서, 이들 세포주에서 발현된 Ab는 그의 탄수화물에 푸코스가 결여되어 있다. EP1176195는 또한 기능적으로 파괴된 FUT8 유전자를 갖는 세포주, 뿐만 아니라 Ab의 Fc 영역에 결합하는 N-아세틸글루코사민에 푸코스를 부가하는 활성이 거의 또는 전혀 없는 세포주, 예를 들어 래트 골수종 세포주 YB2/0 (ATCC CRL 1662)을 기재한다. 감소된 푸코실화를 갖는 Ab를 포함한 Ab를 생산하는 많은 다른 방법이 관련 기술분야에 기재되어 있다. 본원에 개시된 저푸코실화 또는 nf 키메라, 인간화 또는 인간 항-hCCR8 Ab는 푸코실화에 필수적인 FUT8 효소가 결여된 Expi293 Fut8^{-/-} 녹-아웃 세포 (써모 피셔 사이언티픽 (Thermo Fisher Scientific), 캘리포니아주 샌디에고)에서의 발현에 의해 생산되었다.

[0124] nf Ab는 푸코실화 Ab와 비교하여 크게 증진된 ADCC를 나타내기 때문에, Ab 제제는 본 발명의 방법에 유용하도록 푸코실화 중쇄를 완전히 함유하지 않을 필요는 없다. 푸코실화된 중쇄의 잔류 수준은 실질적으로 nf 중쇄의 제제의 ADCC 활성을 유의하게 방해하지 않을 것이다. 그럼에도 불구하고, 코어 푸코스를 N-글리칸에 부가하기에 충분히 적격한 통상적인 CHO 세포에서 생산된 Ab는 수 퍼센트에서 최대 15%의 nf Ab를 포함할 수 있다. nf Ab는 CD16에 대한 약 10배 더 높은 친화도, 및 ADCC 활성의 최대 30배 내지 100배의 증진을 나타낼 수 있고, 따라서 nf Ab의 비율의 약간의 증가조차도 제제의 ADCC 활성을 대폭 증가시킬 수 있다. 배양물 중에서 정상 CHO 세포, 예를 들어 글리코실화 기구가 변경되지 않은 야생형 CHO 세포에서 생산될 것보다 더 많은 nf Ab를 포함하는 임의의 제제가 일정 수준의 강화된 ADCC를 나타낼 수 있다. 이러한 Ab 제제는 본원에서 감소된 푸코실화를 갖는 제제로서 지칭된다. 정상 CHO 세포, 예를 들어 야생형 CHO 세포로부터 수득된 비푸코실화의 원래 수준에 따라, 감소된 푸코실화 제제는 50%, 30%, 20%, 10% 및 심지어 5%만큼 적은 nf Ab를 포함할 수 있다. 감소된 푸코실화는 정상 CHO 세포에서 제조된 Ab와 비교하여 ADCC의 약 2배 이상의 증진을 나타내는 제제로서 기능적으로 정의될 수 있고, nf 중의 임의의 고정된 백분율을 기준으로 하지 않는다.

[0125] 그러나, 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 비푸코실화의 수준은 구조적으로 정의된다. 구체적으로, "비푸코실화된" (nf) 또는 "비-푸코실화된" (동의로로 사용된 용어) Ab 제제는 95% 초과와 nf Ab 중쇄 (100% 포함)를 포함하는 Ab 제제이고; "저푸코실화된"은 중쇄의 80 내지 95%가 푸코스가 결여된 Ab 제제를 지칭하고; "저푸코실화된 또는 비푸코실화된"은 중쇄의 80% 이상이 푸코스가 결여된 Ab 제제를 지칭한다.

[0126] Ab 제제 중의 푸코실화 수준은 겔 전기영동, 액체 크로마토그래피 (LC), 및 질량 분광측정법 (MS)을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 달리 나타내지 않는 한, 본 발명의 목적을 위해, Ab 제제 내의 푸코실화 수준은 친수성 상호작용 크로마토그래피 (또는 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피, HILIC)에 의해 결정된다. Ab 제제의 푸코실화 수준을 결정하기 위해, 샘플을 PNGase F로 변성 처리하여 N-연결된 글리칸을 절단하고, 이어서 이를 푸코스 함량에 대해 분석한다. 전장 Ab 쉘의 LC/MS는 Ab 제제의 푸코실화 수준을 검출하는 대안적 방법이지만, 질량 분광분석법은 본질적으로 덜 정량적이다.

[0127] 치료적 항-hCCR8 mAb는 ADCC에 대한 높은 잠재력을 가져야 한다

[0128] 예비 면역화 실험에서 항-CCR8 Ab를 생성하는 데 있어서 본 발명자들이 직면한 큰 어려움 때문에, 상기 및 실시예 8에 기재된 바와 같이 매우 다양한 항원을 사용하여 궁극적으로 면역화를 수행하였다. 생성된 하이브리도마를 실시예 9에 기재된 바와 같이 스크리닝하여 CCR8 및 CCR8 N-말단 펩티드에 대한 Ab 결합을 확인하였다. 선택된 마우스 Ab를 실시예 10에 기재된 바와 같이 인간화하였다.

[0129] 또한, 1회 이상의 면역화를 포함하는 면역화 스케줄로 설치류를 1종 이상의 hCCR8 항원으로 적어도 1회 면역화시키는 것을 포함하는, CCR8에 대한 Ab를 생성하는 방법이 제공되며, 여기서 면역화 스케줄은 면역화 중 적어도

1회에서 hCCR8의 잔기 Y15 및 Y17을 포함하는 KLH-접합된 hCCR8 펩티드인 hCCR8 항원을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 잔기 Y15 및 Y17은 술포티로신 잔기이다. 바람직하게는, Y15 및 Y17 둘 다의 잔기는 술포티로신 잔기이다.

[0130] 임의로, hCCR8 펩티드는 hCCR8의 적어도 가장 N-말단의 25, 30, 또는 35개의 아미노산을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 임의로, hCCR8 펩티드는 hCCR8의 가장 N-말단의 35개의 아미노산으로 이루어진다.

[0131] 임의로, 설치류는 마우스, 래트 또는 햄스터이다. 바람직하게는, 설치류는 마우스이다.

[0132] 임의로, 설치류는 단독으로 또는 KLH-접합된 hCCR8 펩티드와 조합하여, 면역화 중 적어도 1회에서 hCCR8을 발현하는 세포 또는 바람직하게는 CCR8을 발현하는 세포로부터 단리된 형질 막-풍부화 분획으로 면역화된다. 임의로, 면역화 스케줄은 hCCR8을 발현하는 HEK 293F 세포 및 KLH-접합된, N-말단 hCCR8 펩티드로 설치류를 면역화하는 것을 포함한다. 임의로, 면역화 스케줄은 hCCR8을 발현하는 BAF3 세포의 형질 막 풍부화된 분획 및 KLH-접합된 hCCR8 펩티드로 설치류를 면역화하는 것을 포함한다.

[0133] 특정 측면에서, 본 개시내용은 세포의 표면 상에 발현된 CCR8에 특이적으로 결합하고 ADCC에 의한 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, mAb 또는 그의 항원-결합 부분이 결합하는 CCR8은 hCCR8이고, 그의 서열은 서열식별번호: 1로 제시된다. 다른 실시양태에서, CCR8은 mCCR8이고, 그의 서열은 서열식별번호: 120으로 제시된다.

[0134] 인간 IgG1 및 IgG3 Ab 이소형은 활성화 Fc γ 수용체, 특히 인간 NK 세포 및 단핵구에 의해 발현되는 CD16 (Fc γ RIIIa) 수용체와의 결합을 통해 ADCC를 매개할 수 있다 (표 1 참조). 상업화된 많은 치료적 Ab는 인간 IgG1 이소형을 갖고, 이것은 다른 인간 Ab 이소형과 비교할 때 강한 ADCC 및 CDC를 유도할 수 있다. 추가로, 치료적 IgG1 Ab는 혈액에서 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합을 통해 매개되는 장기 안정성을 갖는다. 항-CD20 리툭시맵 (리툭산(RITUXAN)®) (Dall'Ozzo et al., 2004), 항-Her2 트라스투주맵 (헤르셉틴(HERCEPTIN)®) (Gennari et al., 2004), 항종양 괴사 인자- α (항-TNF- α) 인플릭시맵 (레미케이드(REMICADE)®) (Louis et al., 2004) 및 항-RhD (Miescher et al., 2004)를 포함한 여러 치료적 Ab의 활성은 적어도 부분적으로 ADCC에 의해 매개된다.

[0135] 개시된 발명의 특정 실시양태에서, 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 IgG1 또는 IgG3 이소형의 중쇄 불변 영역을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 IgG1의 것이다.

[0136] 본 발명은 또한 상응하는 비변형된 mAb 또는 그의 항원-결합 부분과 비교하여 Fc γ R에 더 높은 친화도로 결합하고 증진된 ADCC를 매개하는 변형된 중쇄 불변 영역을 포함하는 변형된 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다. 특정 실시양태에서, 변형된 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은, 예를 들어 NK 세포 용해 검정, 예를 들어 실시예 17에 기재된 NK 세포 용해 검정에서 세포 용해에 대한 EC₅₀의 감소에 의해 측정시, 적어도 (a) 약 2배 증진된 ADCC 활성; (a) 약 5배 증진된 ADCC 활성; (c) 약 10배 증진된 ADCC 활성; (d) 약 30배 증진된 ADCC 활성, 또는 (e) 약 100배 증진된 ADCC 활성을 매개한다. 특정 실시양태에서, 변형된 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 감소된 푸코실화를 나타내는 변형된 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함한다.

[0137] 추가 실시양태에서, 변형된 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 저푸코실화 또는 비푸코실화된 변형된 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특정의 다른 실시양태에서, 변형된 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 증진된 ADCC를 매개하는 돌연변이 또는 다수의 돌연변이를 함유하는 변형된 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함한다. 추가 실시양태에서, 돌연변이 또는 돌연변이의 다중도는 G236A; S239D; F243L; E333A; G236A/I332E; S239D/I332E; S267E/H268F; S267E/S324T; H268F/S324T; G236A/S239D/I332E; S239D/A330L/I332E; S267E/H268F/S324T; 및 G236A/S239D/A330L/I332E로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 변형된 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 저푸코실화 또는 비푸코실화된 변형된 IgG1 중쇄 불변 영역을 포함하고, 증진된 ADCC를 매개하는 돌연변이 또는 다수의 돌연변이, 예컨대 상기 열거된 것을 추가로 함유한다.

[0138] ADCC를 매개하는 항-hCCR8 mAb에 대한 기능적 스크리닝

[0139] 인간, 인간화 및 키메라 항-hCCR8 mAb 클론을 기능적으로 스크리닝하여, hCCR8에 고친화도로 결합하고 (실시예 11), CCR8-발현 인간 세포에 특이적으로 결합하고 (실시예 14), CCR8에 대한 CCL1 리간드의 결합을 차단하고 (실시예 15), 이러한 세포의 표면 상에서 CCR8에 결합되었을 때 Treg를 포함한 CCR8-발현 세포의 ADCC를 매개하고 (실시예 17, 19 및 20), 세포 CCR8의 내재화를 유발하지 않고 (실시예 21), 시험관내에서 (실시예 22) 및 생

체의 인간 종양 슬라이스 샘플에서 인간 종양-연관 Treg의 고갈을 촉진하고 (실시예 20), 정상 조직에서 CCR8⁺ T 세포를 보존하면서 종양 Treg의 고갈을 특이적으로 매개하고 (실시예 24), 마우스에게 단독요법으로서 또는 체크포인트 억제제와 조합하여 투여되었을 때 전임상 마우스 종양 모델에서 종양 성장을 감소시키는 (실시예 23-29) Ab를 포함한, 치료적 Ab에서 바람직한 특성을 나타내는 Ab를 확인하였다.

[0140] 초기에 나노몰-미만의 EC₅₀ 값으로 인간 세포 상의 CCR8에 결합하고, CCR8을 발현하지 않는 다양한 인간 조직에 대한 교차-반응성 없이 CCR8-발현 세포에 특이적으로 결합하는 것으로 나타나면, 추가의 특징화를 위해 클론을 선택하였다. 이들 Ab 내의 가변 영역을 코딩하는 DNA를 차세대 서열분석에 의해 서열분석하고, 클론을 서열 상동성 및 제한된 잠재적 서열 문제, 예를 들어 아스파라긴 탈아미드화, 메티오닌 산화 및 글리코실화 부위에 기초하여 다양성을 위해 선택하였다. CCR8-발현 세포의 ADCC를 매개하는 데 있어서의 그의 효력, 결합 동역학 및 서열 패밀리 다양성에 기초하여, 특정 선택된 클론 mAb를 치료적 Ab에서 바람직한 것으로 간주되는 기능, 예컨대 마우스 종양 모델에서 종양 성장을 억제하는 능력에 대해 추가로 시험하고, 서열 문제를 완화시키고, 결합 친화도를 최적화하고, 배선 아미노산으로 복귀시키기 위한 서열 최적화에 적용시켰다. 선택 mAb를 또한 다양한 수단 예컨대 분석용 크기 배제 크로마토그래피, 모세관 등전 포커싱, 소수성 평가, 열 안정성 및 응집 잠재력을 통해 그의 생물물리학적 특성에 대해 분석하여, 추가의 개발에 적합한 클론을 확인하였다.

[0141] CCR8에 대한 항-CCR8 mAb의 결합 친화도의 특징화

[0142] 본 발명의 특정 항-CCR8 mAb는 높은 친화도로 hCCR8에 결합한다. Ab는 전형적으로 1 μ M 내지 10 pM 이하의 해리 상수 (K_D)에 의해 반영되는 높은 친화도로 그의 동족 항원에 특이적으로 결합한다. 약 100 μ M 초과 임의의 K_D 는 일반적으로 비특이적 결합을 나타내는 것으로 간주된다. 본원에 사용된 항원에 "특이적으로 결합하는" IgG Ab는 상기 항원 및 실질적으로 동일한 항원에, K_D 가 약 100 nM 이하, 바람직하게는 약 10 nM 이하, 보다 바람직하게는 약 5 nM 이하, 보다 더 바람직하게는 약 5 nM 내지 0.1 nM 이하임을 의미하는 높은 친화도로 결합하지만, 비관련 항원에는 높은 친화도로 결합하지 않는 Ab를 지칭한다. 항원이 주어진 항원에 대해 고도의 서열 동일성을 나타내는 경우에, 예를 들어 주어진 항원의 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 97%, 또는 보다 더 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 나타내는 경우에, 이러한 항원은 주어진 항원과 "실질적으로 동일하다".

[0143] 본원에 사용된 용어 " K_D "는, k_{off} 대 k_{on} (즉, k_{off}/k_{on})의 비로부터 취득되고 몰 농도 (예를 들어, nM)로서 표현되는, 특정한 Ab-항원 상호작용에 대한 해리 상수를 지칭하는 것으로 의도된다. 용어 " k_{on} "은 Ab 및 그의 항원 상호작용의 회합에 대한 회합 속도 또는 "온 레이트"를 지칭하고, 용어 " k_{off} "는 Ab-항원 복합체에 대한 해리 속도를 지칭한다. Ab에 대한 K_D 값은 관련 기술분야에 널리 확립된 방법, 예컨대 표면 플라즈몬 공명 (SPR), 동역학적 배제 검정 (키넥사(KinExA)®; 사피다인 인스트루먼트즈(Sapidyne Instruments), 아이다호주 보이시), 또는 생물층 간섭측정법 (BLI; 포르테바이오(ForteBio), 캘리포니아주 프리몬트)을 사용하여 결정될 수 있다. 단일 Ab에 대해 상이한 방법에 의해 결정된 K_D 값은, 예를 들어 1,000배까지 상당히 달라질 수 있다. 따라서, 상이한 Ab에 대한 K_D 값을 비교하는 데 있어서, 이러한 K_D 값을 동일한 방법을 사용하여 결정하는 것이 중요하다. 명백하게 언급되지 않는 경우, 및 문맥상 달리 나타내지 않는 한, 본원에 개시된 Ab 결합에 대한 K_D 값은 비아코어(BIACORE)® 바이오센서 시스템 (지이 헬스케어(GE Healthcare), 일리노이주 시카고)을 사용하여 SPR에 의해 결정하였다.

[0144] 표적, 예컨대 hCCR8에의 Ab 결합에 대한 결합 친화도는 또한 최대 결합의 절반을 달성하는 Ab의 농도인 CCR8-발현 세포주에의 결합에 대한 EC₅₀을 측정함으로써 결정될 수 있다. CCR8을 발현하는 CHO, 293F, Raji 세포주에 대한 mAb 결합의 연구는 1 nM 미만의 EC₅₀을 나타냈다 (도 11A). 활성화된 Treg에 결합되었을 때, 이러한 Ab는 더 넓은 범위의 결합 친화도를 나타냈고, 이때 Ab의 절반 미만이 1 nM 미만의 EC₅₀으로 결합함을 나타냈다 (도 11A). 도 11B에 제시된 선택된 mAb 세트는 피코몰 내지 나노몰 범위의 EC₅₀을 나타낸다.

[0145] 따라서, 개시된 발명의 특정 실시양태에서, 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 약 10 nM 이하; 바람직하게는 약 5 nM 이하; 바람직하게는 약 2 nM 이하; 보다 바람직하게는 약 1.7 nM 이하; 보다 바람직하게는 약 1 nM 이하; 보다 바람직하게는 약 0.5 nM 이하; 보다 더 바람직하게는 약 0.1 nM 이하의 EC₅₀으로 인간 CCR8-발현 CHO 세포에 특이적으로 결합한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은

hCCR8-발현 CHO 세포에 약 0.1 nM의 EC₅₀으로 결합한다. 특정의 다른 바람직한 실시양태에서, 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 hCCR8-발현 CHO 세포에 약 1.7 nM의 EC₅₀으로 결합한다. 특정 실시양태에서, mAb는 약 0.1 nM 내지 약 10 nM의 EC₅₀으로 결합한다. 특정의 다른 실시양태에서, EC₅₀은 약 0.1 nM 내지 약 2 nM이다. 특정의 다른 실시양태에서, EC₅₀은 약 0.5 nM 내지 약 5 nM이다. 특정의 바람직한 실시양태에서, EC₅₀은 약 1 nM 내지 약 2 nM이다. 다른 실시양태에서, mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 hCCR8에 약 0.5 nM 내지 약 1 nM의 EC₅₀으로 결합한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, EC₅₀ 값은 실시예 11에 기재된 결합 검정에 의해 측정된다.

[0146] 본 발명의 특정의 다른 실시양태에서, 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 활성화된 인간 Treg에 약 50 nM 이하, 약 14 nM 이하, 약 10 nM 이하; 바람직하게는 약 5 nM 이하; 보다 바람직하게는 약 2 nM 이하; 보다 바람직하게는 약 0.5 nM 이하; 보다 바람직하게는 약 0.3 nM 이하; 보다 더 바람직하게는 약 0.1 nM 이하; 보다 더 바람직하게는 약 0.03 nM 이하의 EC₅₀으로 특이적으로 결합한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 약 1.7 nM의 EC₅₀으로 hCCR8-발현 CHO 세포에 결합한다. 특정 실시양태에서, mAb는 약 0.03 nM 내지 약 10 nM의 EC₅₀으로 결합한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, EC₅₀은 약 0.1 nM 내지 약 5 nM이다. 보다 바람직한 실시양태에서, mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 약 0.2 nM 내지 약 2 nM의 EC₅₀으로 인간 hCCR8에 결합한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, EC₅₀ 값은 실시예 11에 기재된 결합 검정에 의해 측정된다.

[0147] 선택된 항-hCCR8 mAb의 Fab 단편인 4A19는 X선 결정학에 의해 hCCR8의 N-말단 펩티드 내의 잔기 15-21을 포함하는 에피토프에 결합하는 것으로 나타났고 (실시예 11), 이때 황산화 티로신-17 잔기는 에피토프의 중심에 있었다 (도 12A). 따라서, 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 X선 결정학에 의해 결정시에 인간 CCR8의 N-말단 에피토프에 결합하며, 여기서 에피토프는 서열 Y₁₅Y₁₆Y₁₇P₁₈D₁₉I₂₀F₂₁ (서열 식별번호: 2)을 갖는 펩티드 내의 적어도 1개의 아미노산을 포함한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 에피토프 펩티드는 황산화 티로신-17 잔기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 에피토프는 서열식별번호: 2의 서열을 갖는 펩티드 내의 2, 3, 4, 5, 6개 또는 모든 아미노산을 포함한다.

[0148] 4A19 Fab 단편에 대한 이중으로 황산화 펩티드 (Y15 및 Y17 황산화됨)의 결합은 에피토프의 중심의 정체 및 배향을 확인하였다. 이는 추가로 hCCR8의 N-말단 잔기 12-22 (VTDDYYPDIFS; 서열식별번호: 109)를 포함하는 보다 연장된 선형 에피토프의 묘사를 허용하였다 (도 12B). 모노설페이트화 펩티드에 의해 밝혀진 것으로부터의 에피토프의 연장은 아마도 sulfo-Y15가 hCCR8 N-말단 펩티드의 보다 큰 절편을 정돈한 결과이며, 이는 4A19 Ab와 그의 상호작용의 가시화를 가능하게 한다. 이중 황산화 펩티드를 갖는 구조에서 관찰된 에피토프 서열은 mAb 4A19에 의해 결합된 전체 에피토프를 구성할 수 있는데, 이는 이 Ab가 hCCR8 N-말단에 대한 면역 반응을 증진시키기 위해 hCCR8 N-말단 펩티드를 사용한 다중 면역화를 수반하는 면역화 전략을 사용하여 생성되었기 때문이다. N-말단 펩티드 내의 다른 아미노산 잔기가 에피토프의 일부를 형성했다면, 이것은 아마도 결정 구조에서 관찰되었을 것이지만, 그렇지 않다 (도 12B).

[0149] 따라서, 특정의 바람직한 실시양태에서, 4A19에 의해 결합된 에피토프 펩티드는 황산화 티로신-15 및 티로신-17 잔기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 펩티드의 아미노산 Y₁₅ 및/또는 Y₁₇은 황산화된다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 이러한 펩티드의 아미노산 Y₁₅ 및 Y₁₇ 둘 다는 황산화된다.

[0150] 본 개시내용은 ADCC를 매개할 수 있고, 서열이 서열식별번호: 1로 제시된 hCCR8 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 Ab, 예를 들어 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분을 제공하고, 여기서 에피토프는 X선 결정학에 의해 결정시에 hCCR8의 N-말단 도메인에 대략 아미노산 잔기 15 내지 21 (Y₁₅Y₁₆Y₁₇P₁₈D₁₉I₂₀F₂₁; 서열식별번호: 2)에 걸쳐 있는 펩티드 내에 위치한다. 특정 실시양태에서, 에피토프는 서열 Y₁₅Y₁₆Y₁₇P₁₈D₁₉I₂₀F₂₁ (서열식별번호: 2)을 갖는 펩티드 내의 적어도 1개의 아미노산을 포함한다. 다른 실시양태에서, 에피토프는 서열 Y₁₅Y₁₆Y₁₇P₁₈D₁₉I₂₀F₂₁ (서열식별번호: 2)을 갖는 펩티드 내의 2, 3, 4, 5, 6개 또는 모든 아미노산을 포함한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 에피토프는 서열식별번호: 2의 서열을 갖는 7개의 모든 아미노산을 포함한다.

[0151] 본 개시내용은 또한 ADCC를 매개할 수 있고, 서열이 서열식별번호: 1로 제시된 hCCR8 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 Ab, 예를 들어 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분을 제공하고, 여기서 에피토프는 X선 결정학에 의해

결정시에 hCCR8의 N-말단 도메인에 대략 아미노산 잔기 12 내지 22 ($V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$; 서열식별번호: 109)에 걸쳐 있는 펩티드 내에 위치한다. 특정 실시양태에서, 에피토프는 서열 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (서열식별번호: 109)를 갖는 펩티드 내의 적어도 1개의 아미노산을 포함한다. 다른 실시양태에서, 에피토프는 서열 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (서열식별번호: 109)를 갖는 펩티드 내의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 모든 아미노산을 포함한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 에피토프는 서열식별번호: 109의 서열을 갖는 11개의 모든 아미노산을 포함한다. 특정의 다른 실시양태에서, 에피토프는 서열식별번호: 109의 서열을 갖는 펩티드로 이루어진다.

[0152] 본 발명의 특정 측면에서, 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 황산화 tyr-15 및 tyr-17 잔기를 포함하는 hCCR8의 N-말단 펩티드 (예를 들어, 위치 tyr-15 및 tyr-17에서 황산화된 N-말단 CCR8 잔기 1-35의 펩티드 (CCR8-2sulfo))에 약 100 nM 이하; 바람직하게는 약 50 nM 이하; 바람직하게는 약 10 nM 이하; 보다 바람직하게는 약 5 nM 이하; 보다 바람직하게는 약 1.6 nM 이하; 보다 바람직하게는 약 1.0 nM 이하; 보다 더 바람직하게는 약 0.5 nM 이하; 보다 더 바람직하게는 약 0.1 nM 이하의 K_D 로 결합한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 N-말단 에피토프 펩티드, 예를 들어 위치 Tyr15 및 Tyr17에서 황산화된 N-말단 CCR8 잔기 1-35의 펩티드 (CCR8-2sulfo))에 약 1.6 nM의 K_D 로 결합한다. 특정 실시양태에서, mAb는 약 100 nM 내지 약 0.1 nM의 K_D 로 결합한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, K_D 는 약 50 nM 내지 약 0.5 nM이다. 보다 바람직한 실시양태에서, mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 약 10 nM 내지 약 1 nM의 K_D 로 결합한다. 보다 더 바람직한 실시양태에서, mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 약 2 nM 내지 약 1 nM의 K_D 로 결합한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, K_D 값은 실시예 11에 기재된 SPR 방법에 의해 측정된다.

[0153] hCCR8의 N-말단에서의 티로신 (tyr-15 및 tyr-17)의 황산화는 4A19 Ab의 결합에 요구된다 (실시예 11 참조). 단지 1개의 티로신 잔기인 tyr-15가 술포일화된 경우에, 4A19 Fab 단편은 N-말단 펩티드에 덜 단단하게 결합하며, 이는 이중으로 황산화된 펩티드보다 10배 초과로 더 높고 약 1,000배 더 높은 K_D 에 의해 입증된 반면, 단지 tyr-17이 황산화된 경우에는 친화도가 대략 10배 감소된다 (표 5). 따라서, 본 발명은 약 100 nM 이하; 바람직하게는 약 50 nM 이하; 바람직하게는 약 25 nM 이하; 보다 바람직하게는 약 10 nM 이하; 보다 더 바람직하게는 약 1.0 nM 이하의 단일 황산화 잔기 tyr-17 (CCR8-sulfoY17)을 포함하는 hCCR8의 N-말단 펩티드에 결합하는 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 약 20 nM의 K_D 로 단일 술포일화된 에피토프 펩티드에 결합한다. 특정 실시양태에서, mAb는 약 100 nM 내지 약 1 nM의 K_D 로 결합한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, K_D 는 약 50 nM 내지 약 10 nM이다. 보다 바람직한 실시양태에서, mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 약 30 nM 내지 약 20 nM의 K_D 로 결합한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, K_D 값은 실시예 11에 기재된 SPR 방법에 의해 측정된다.

[0154] 항-hCCR8 mAb의 조직 교차-반응성

[0155] 치료적 항-CCR8 mAb는 CCR8을 발현하는 표적 세포를 고갈시키는 데 사용될 것이기 때문에, mAb가 의도된 표적 세포, 즉 중앙-침윤 Treg에 특이적으로 결합하고, 그의 고갈이 독성 또는 바람직하지 않은 부작용을 유도할 신체 내의 다른 필수 세포 유형에 결합하지 않는 것이 중요하다. 따라서, 후보 mAb를 매우 다양한 정상 인간 조직 유형에의 결합에 대해 시험하였다 (실시예 14). 항-hCCR8 mAb 18Y12 및 4A19는 주로 흉선의 수질 및 피부의 진피에서 회귀하고 산란된 면역 세포에 결합하는 것으로 나타난 반면, 조사된 다수의 다른 조직에서는 결합이 관찰되지 않았다. 또 다른 mAb인 16B13은 PBMC, 및 림프성 기관 및 림프성-풍부 조직에서의 면역 세포를 포함한 다양한 인간 조직, 및 면역 세포가 존재하는 많은 조직에 비특이적으로 결합하는 것으로 관찰되었다. 염색은 세포질 패턴을 나타냈다. 세포 표면 상의 CCR8이외의 표적에 비특이적으로 결합하는 16B13과 같은 Ab는 이들이 나타낼 수 있는 다른 바람직한 기능적 특성에도 불구하고 고갈을 위해 CCR8-발현 세포를 표적화하는 치료 용도에 적합하지 않다.

[0156] 따라서, 본 개시내용은 CCR8-발현 세포, 예컨대 중앙 Treg, 및 흉선의 수질 및 피부의 진피에서 회귀하고 산란된 면역 세포에 특이적으로 결합하지만, 대뇌, 소뇌, 심장, 간, 폐, 신장, 편도, 비장, 흉선, 결장, 위, 췌장, 부신, 뇌하수체, 피부, 말초 신경, 고환 또는 자궁 조직, 또는 PBMC를 포함한 매우 다양한 인간 조직에는 결합하지 않는 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다. 예를 들어, 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 중앙-침윤 Treg에 특이적으로 결합하지만 PBMC에는 결합하지 않을 수 있으며, 예를 들어 고정된 PBMC에

서 세포질 염색을 나타내지 않을 수 있다. 상기 언급된 목록의 세포 및 조직에 대한 Ab의 비-결합은, 예를 들어 고정된 조직 샘플 상에서, 예를 들어 실시예 14에 기재된 방법에 의해, 예를 들어 관련 Ab로의 표준 염색을 수행함으로써 확립될 수 있다.

[0157] 항-CCR8 mAb에 의한 CCR8/리간드 신호전달의 억제

[0158] 실시예 15 및 16에서, 각각 hCCR8 및 mCCR8에 결합하는 hCCL1 및 mCCL1의 차단, 및 항-CCR8 mAb에 의한 CCR8/CCL1 신호전달의 차단은, CHO 세포 상의 CCR8의 CCL1 결속이 칼슘 (Ca) 유동을 유도하기 때문에 CCR8-발현 CHO 세포주에 대해 Ca 유동 검정을 수행함으로써 시험하였다. CCL1은 CCR8에 결합하는 것으로 공지된 유일한 리간드이다. 연구는 CCR8에 대한 CCL1 결합이 시험관내 검정에서 Treg 억제를 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라 마우스 모델에서 자가면역 염증 반응을 억제할 수 있다는 것을 제시하였다 (Barshesht et al., 2017). SA1N 섬유육종 모델에서의 차단 항-CCR8 Ab 또한 부분적인 항종양 효능을 입증하였다 (도 28A). 따라서, 본 발명의 특정 실시양태에서, 본 발명의 항-CCR8 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 CCR8, 예를 들어 hCCR8 또는 mCCR8에 대한 CCL1의 결합을 억제하고, CCR8/CCL1 신호전달을 억제한다. 바람직한 실시양태에서, Ca 유동의 억제는 각각 hCCR8 및 mCCR8에 대해 실시예 15 및 16에 기재된 바와 같이 측정된다.

[0159] 특정 실시양태에서, 항-hCCR8 mAb는 CCR8/CCL1 신호전달을 약 10 nM 이하; 약 5 nM 이하; 바람직하게는 약 1 nM 이하; 보다 바람직하게는 약 0.5 nM 이하; 보다 바람직하게는 약 0.1 nM 이하; 보다 더 바람직하게는 약 0.01 nM 이하의 IC₅₀으로 억제한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-hCCR8 mAb는 약 0.5 nM의 IC₅₀으로 CCR8/CCL1 신호전달을 억제한다. 특정 실시양태에서, 항-hCCR8 Ab는 약 0.01 nM 내지 약 10 nM의 IC₅₀으로 CCR8/CCL1 신호전달을 억제한다. 특정의 다른 실시양태에서, 항-hCCR8 Ab는 약 0.05 nM 내지 약 5 nM의 IC₅₀으로 CCR8/CCL1 신호전달을 억제한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-hCCR8 Ab는 약 0.1 nM 내지 약 1 nM의 IC₅₀으로 CCR8/CCL1 신호전달을 억제한다. 보다 바람직한 실시양태에서, 항-hCCR8 Ab는 약 0.2 nM 내지 약 0.5 nM의 IC₅₀으로 CCR8/CCL1 신호전달을 억제한다. 이들 IC₅₀ 값은 실시예 15에 기재된 검정에 기초한다.

[0160] 항-CCR8 mAb에 의한 CCR8-발현 세포의 ADCC-매개 사멸

[0161] 항-hCCR8 및 항-mCCR8 mAb가 CCR8-발현 세포의 ADCC-매개된 사멸을 유도하는 능력을, Fc 수용체를 발현하는 인간 또는 마우스 리포터 세포의 가교를 유도하는 능력을 측정함으로써 간접적으로 평가하였다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 CD16 가교 검정에 의해 측정된 바와 같은 EC₅₀으로 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개한다. 바람직한 실시양태에서, ADCC 전위는 각각 hCCR8 및 mCCR8에 대해 실시예 17 및 18에 기재된 가교 검정에 의해 측정된다.

[0162] 특정 실시양태에서, 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 약 100 pM 이하; 바람직하게는 약 30 pM 이하; 바람직하게는 약 10 pM 이하; 바람직하게는 약 3 pM 이하; 보다 바람직하게는 약 1 pM 이하; 보다 바람직하게는 약 0.5 pM 이하; 보다 바람직하게는 약 0.1 pM 이하; 또는 보다 더 바람직하게는 약 0.05 pM 이하의 EC₅₀ (CD16 가교 검정에 의해 측정됨)으로 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-hCCR8 mAb는 약 0.7 pM의 EC₅₀으로 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개한다. 특정 실시양태에서, 항-hCCR8 Ab는 약 0.05 pM 내지 약 50 pM, 바람직하게는 약 0.1 pM 내지 약 10 nM; 보다 바람직하게는 약 0.3 nM 내지 약 7 nM; 보다 더 바람직하게는 약 0.6 nM 내지 약 3 nM의 EC₅₀으로 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개한다. 이들 EC₅₀ 값은 실시예 17에 기재된 CD16 가교 검정에 기초한다.

[0163] 활성화된 Treg 및 환자 종양 Treg의 직접적인 사멸이 실시예 19 및 20에서 입증되었다. 특정 실시양태에서, 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 약 500 pM 이하; 바람직하게는 약 100 pM 이하; 바람직하게는 약 30 pM 이하; 보다 바람직하게는 약 15 pM 이하; 보다 더 바람직하게는 약 5 pM 이하; 또는 보다 더 바람직하게는 약 1 pM 이하의 EC₅₀ (아포토시스 검정에 의해 측정됨)으로 활성화된 Treg의 고갈을 매개한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-hCCR8 mAb는 약 13 pM의 EC₅₀으로 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개한다. 특정 실시양태에서, 항-hCCR8 mAb는 약 1 pM 내지 약 500 pM, 바람직하게는 약 5 pM 내지 약 100 pM; 보다 바람직하게는 약 10 pM 내지 약 50 pM의 EC₅₀으로 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개한다. 이들 EC₅₀ 값은 실시예 19에 기재된 아포토시스 검정에 기초한다.

[0164] 항-CCR8 mAb에 의한 CCR8의 내재화 없음

- [0165] 특정 세포 표면 수용체에 특이적인 Ab는 치료 용도를 위한 특정 약물, 독소 또는 효소의 표적화된 전달에 필수적일 수 있는 수용체-매개 세포내이입을 통해 수용체의 내재화를 유도한다. 도 19에 제시된 바와 같이, 항-유도성 T 세포 공동-자극제 (ICOS) mAb는 가교 Ab의 부재 하에 ICOS 수용체의 내재화를 유발하지 않지만, 가교 Ab의 존재 하에서는 유의한 ICOS 내재화를 유발한다. 대조적으로, 항-CCR8 mAb는 가교 Ab의 존재 또는 부재 하에 CCR8의 내재화를 유발하지 않는다. 항-CCR8 Ab에 의한 CCR8의 내재화는 Treg 세포 표면으로부터 수용체의 제거로 인해 Treg 고갈을 매개하는 그의 능력을 감소시킬 것이다. 따라서, 항-CCR8 Ab에 의한 CCR8 내재화의 결여는 이들 Ab의 치료 잠재력을 추가로 입증한다. CCR8 내재화는 관련 기술분야에서 사용되는 표준 기술, 예를 들어 실시예 21의 실험 프로토콜에 의해 측정될 수 있다.
- [0166] 따라서, 본 발명은 세포 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때, 가교 Ab의 존재 또는 부재하에서 CCR8의 내재화를 유발하지 않는 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 세포 표면 상에서 CCR8을 발현하는 세포는 Treg이다.
- [0167] 시험관내 및 생체의 환자 종양 샘플에서의 인간 종양 Treg의 고갈
- [0168] 종양 Treg의 고갈을 매개하는 항-hCCR8 mAb의 능력을 소화된 환자 종양이 동종 NK 세포와 공동-배양된 시험관내 시스템에서 평가하였다 (실시예 22). 항-hCCR8 mAb인 4A19는 Teff의 집단을 감소시키지 않으면서 종양 Treg의 고갈을 유도하는 것으로 나타났다. mAb 4A19는 이러한 시험관내 검정 시스템에서 항-CCR4-nf mAb보다 Treg 고갈에서 더 효과적이었고 (도 20A), $CD4^+$ 이펙터 T 세포의 고갈을 유도하지 않은 반면, 항-CCR4-nf Ab는 이들 세포의 고갈을 측정가능하게 유발하였다 (도 20B). 항-CCR8도 항-CCR4도 $CD8^+$ 이펙터 T 세포를 고갈시키지 않았다 (도 20C).
- [0169] 항-hCCR8 mAb가 종양 Treg의 고갈을 유도하는 능력을 또한 슬라이싱된 환자 종양을 사용하는 생체의 검정 시스템에서 평가하였다 (실시예 20). mAb 16B13-IgG1-nf는 동종 NK 세포의 첨가 없이 Treg 고갈을 매개하는 것으로 나타났다 (도 18H 및 18I).
- [0170] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ 이펙터 T 세포의 집단을 감소시키지 않으면서 시험관내에서 종양 Treg의 고갈을 유도한다. 바람직한 실시양태에서, 시험관내 종양 Treg의 고갈은 실시예 22에 기재된 검정을 사용하여 측정된다.
- [0171] 특정의 다른 실시양태에서, 본 발명의 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 생체의 환자 종양 조직 샘플에서 종양 Treg의 고갈을 유도한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 생체의 환자 종양 조직 샘플에서의 종양 Treg의 고갈은 실시예 20에 기재된 검정을 사용하여 측정된다.
- [0172] 정상 조직 샘플에서 특이적으로 CCR8 T 세포가 아닌 종양 Treg의 항-mCCR8-매개된 고갈
- [0173] 종양 Treg 이외에도, CCR8은 또한 흉선 T 세포의 소수의 하위세트, 뿐만 아니라 피부에서 발견되는 희귀 집단인 피부 상주 T 세포 상에서 발현된다. 인간과 매우 유사한 CCR8 발현 프로파일을 나타내는 CT26 마우스 동계 종양 모델에서, 항-mCCR8 고갈 mAb, 항-CCR8-mIgG2a는 종양에서 CCR8⁺ Treg를 선택적으로 고갈시켰지만, 피부, 흉선, 비장 또는 혈액에서 CCR8⁺ T 세포는 고갈시키지 않았다 (실시예 24). 종양에서 항-CCR8-mIgG2a의 고도로 특이적인 고갈 활성은 Ab-결합된 표적 세포에 근접한 Fc γ RIV-발현 세포의 비교적 낮은 빈도 또는 피부, 흉선, 비장 및 혈액에서 CCR8⁺ T 세포 상의 보다 낮은 CCR8 표면 밀도로 인한 것일 수 있지만, 다른 CCR8-발현 기관에서는 그렇지 않다. 이는 Fc γ R을 활성화시키는 데 최적화된 친화도를 갖는 항-CCR8 Ab, 예컨대 4A19 또는 14S15와 같은 인간 또는 인간화 IgG1-nf 항-CCR8 mAb가 CD16 발현이 낮은 피부에서 CCR8⁺ T 세포의 우발적인 고갈 없이 인간 환자에서 강력한 종양 Treg 고갈을 가능하게 할 것이라는 관점을 강하게 뒷받침한다.
- [0174] 개시된 발명의 특정 실시양태에서, 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 피부, 흉선, 비장 및 혈액에서 CCR8⁺ T 세포를 고갈시키지 않으면서 종양 Treg의 고갈을 특이적으로 유도한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 생체내 종양 Treg의 고갈은 실시예 24에 기재된 검정을 사용하여 측정된다.
- [0175] 참조 Ab와 동일한 CCR8 에피토프에 결합하는 항-CCR8 mAb
- [0176] 본 발명은 또한 참조 Ab와 동일한 hCCR8의 에피토프에 결합하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분을 제공하고, 여기서 참조 Ab는 하기를 포함한다:

- [0177] (a) 서열식별번호: 3으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 15로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0178] (b) 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0179] (c) 서열식별번호: 5로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 17로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0180] (d) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0181] (e) 서열식별번호: 7로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 19로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0182] (f) 서열식별번호: 8로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 20으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0183] (g) 서열식별번호: 9로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 21로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0184] (h) 서열식별번호: 10으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 22로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0185] (i) 서열식별번호: 11로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 23으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0186] (j) 서열식별번호: 12로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 24로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0187] (k) 서열식별번호: 13으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 25로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0188] (l) 서열식별번호: 14로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 26으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ; 또는
- [0189] (m) 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L .
- [0190] 특정의 바람직한 실시양태에서, 참조 Ab와 동일한 hCCR8의 에피토프에 결합하는 단리된 Ab, 바람직하게 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분이 제공되며, 여기서 참조 Ab는 하기를 포함한다:
- [0191] (a) 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0192] (b) 서열식별번호: 1144로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ; 또는
- [0193] (c) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L .
- [0194] 특정의 바람직한 실시양태에서, 참조 Ab와 동일한 hCCR8의 에피토프에 결합하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb,

또는 그의 항원-결합 부분이 제공되며, 여기서 참조 Ab는 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 을 포함한다.

[0195] CCR8에의 결합에 대해 참조 Ab와 교차-경쟁하는 항-CCR8 mAb

[0196] 또한, 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하고, hCCR8에의 결합에 대해 참조 Ab 또는 그의 참조 항원-결합 부분과 교차-경쟁하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb 또는 그의 항원-결합 부분이 개시된 발명의 범주 내에 포괄된다. 항원, 예를 들어 CCR8에의 결합에 대해 "교차-경쟁"하는 한 쌍의 Ab의 능력은 제1 Ab가 제2 Ab와 실질적으로 동일한 항원의 에피토프 영역에 결합하여, 제2 Ab가 상기 특정한 에피토프 영역에 결합하는 것을 입체적으로 방해하고, 반대로, 제2 Ab가 제1 Ab와 실질적으로 동일한 항원의 에피토프 영역에 결합하여, 제1 Ab가 상기 에피토프 영역에 결합하는 것을 입체적으로 방해한다는 것을 나타낸다. 따라서, 예를 들어 mAb 14S15 또는 4A19의 hCCR8에 대한 결합을 경쟁적으로 억제하는 시험 Ab의 능력은 시험 Ab가 mAb 14S15 또는 4A19와 실질적으로 동일한 hCCR8의 에피토프 영역에 결합함을 입증한다.

[0197] 제1 Ab가 항원에 대한 제2 Ab의 결합을 적어도 약 40%만큼 감소시키는 경우에, 제1 Ab는 제2 Ab와 "실질적으로 동일한 에피토프"에 결합하는 것으로 간주된다. 바람직하게는, 제1 Ab는 항원에 대한 제2 Ab의 결합을 약 50% 초과 (예를 들어, 적어도 약 60% 또는 적어도 약 70%)만큼 감소시킨다. 보다 바람직한 실시양태에서, 제1 Ab는 항원에 대한 제2 Ab의 결합을 약 70% 초과 (예를 들어, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%)만큼 감소시킨다. 제1 및 제2 Ab의 순서는 역전될 수 있고, 즉 "제2" Ab가 먼저 표면에 결합될 수 있고, 그 후에 "제1" Ab가 "제2" Ab의 존재 하에 표면과 접촉된다. Ab가 고정된 항원에 첨가되는 순서와 무관하게 항원에 대한 결합의 경쟁적 감소가 관찰되는 경우에, Ab는 "교차-경쟁"하는 것으로 간주된다.

[0198] 교차-경쟁 Ab는 그가 CCR8 수용체와 같은 항원의 실질적으로 동일한 에피토프 영역에 결합함에 따라 참조 Ab의 특성과 매우 유사한 기능적 특성을 가질 것으로 예상된다. 교차-경쟁 정도가 더 높을수록, 기능적 특성은 더 유사할 것이다. 예를 들어, 2개의 교차-경쟁 Ab는 그들이 각각 나머지 다른 한 Ab의 에피토프에의 결합을 적어도 약 80%만큼 억제하는 경우에 본질적으로 동일한 기능적 특성을 갖는 것으로 예상된다. 교차-경쟁 Ab가 해리 상수 (K_D)에 의해 측정 시 에피토프에의 결합에 대해 유사한 친화도를 나타내는 경우에 이러한 기능 상의 유사성은 훨씬 더 가까울 것으로 예상된다.

[0199] 교차-경쟁 항-항원 Ab는 재조합 항원 분자 또는 세포-표면 발현된 항원 분자를 사용하여 비아코어® 분석, ELISA 검정 또는 유동 세포측정법을 포함한 표준 항원 결합 검정에서 검출가능하게 경쟁하는 그의 능력에 기초하여 용이하게 확인될 수 있다. 예로서, 시험 Ab가 hCCR8에의 결합에 대해 mAb 4A19와 경쟁하는지 여부를 확인하기 위한 단순 경쟁 검정은 (1) hCCR8가 고정되는 비아코어® 칩 (또는 SPR 분석을 위한 다른 적합한 배지)에의 포화 농도로 적용된 4A19의 결합을 측정하는 것, 및 (2) 시험 Ab가 앞서 결합되어 있는 hCCR8-코팅된 비아코어® 칩 (또는 다른 적합한 배지)에의 4A19의 결합을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 시험 Ab의 존재 및 부재 하에 hCCR8-1-코팅된 표면에 대한 4A19의 결합이 비교된다. 시험 Ab의 존재 하에 4A19의 결합의 유의한 (예를 들어, 약 40% 초과) 감소는 두 Ab 모두가 hCCR8 표적에 대한 결합에 대해 그들이 경쟁하도록 실질적으로 동일한 에피토프를 인식한다는 것을 나타낸다. 항원에 대한 제1 Ab의 결합이 제2 Ab에 의해 억제되는 백분율은 하기와 같이 계산될 수 있다: $[1 - (\text{제2 Ab의 존재 하에 제1 Ab의 검출된 결합}) / (\text{제2 Ab의 부재 하에 제1 Ab의 검출된 결합})] \times 100$. Ab가 교차-경쟁하는지 여부를 결정하기 위해, 4A19의 존재 하에 hCCR8-코팅된 칩에의 시험 Ab의 결합을 측정하는 것을 제외하고는 경쟁적 결합 검정을 반복한다.

[0200] 본원에 개시된 임의의 항-CCR8 Ab는 교차-경쟁 검정에서 참조 Ab로서 기능할 수 있다. 특정 실시양태에서, 참조 Ab는 하기를 포함한다:

[0201] (a) 서열식별번호: 3으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 15로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

[0202] (b) 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

[0203] (c) 서열식별번호: 5로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 17로

제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

- [0204] (d) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0205] (e) 서열식별번호: 7로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 19로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0206] (f) 서열식별번호: 8로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 20으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0207] (g) 서열식별번호: 9로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 21로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0208] (h) 서열식별번호: 10으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 22로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0209] (i) 서열식별번호: 11로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 23으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0210] (j) 서열식별번호: 12로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 24로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0211] (k) 서열식별번호: 13으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 25로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0212] (l) 서열식별번호: 14로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 26으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ; 또는
- [0213] (m) 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L .
- [0214] 특정의 바람직한 실시양태에서, 참조 Ab는 하기를 포함한다:
- [0215] (a) 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0216] (b) 서열식별번호: 1144로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ; 또는
- [0217] (c) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L .
- [0218] 특정의 바람직한 실시양태에서, 참조 Ab는 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 을 포함한다.
- [0219] 구조적으로 정의된 항-CCR8 mAb
- [0220] 본 개시내용은 또한 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하고, 하기 각각에서의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다:
- [0221] (a) 서열식별번호: 3으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 15

로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

- [0222] (b) 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0223] (c) 서열식별번호: 5로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 17로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0224] (d) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0225] (e) 서열식별번호: 7로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 19로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0226] (f) 서열식별번호: 8로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 20으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0227] (g) 서열식별번호: 9로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 21로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0228] (h) 서열식별번호: 10으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 22로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0229] (i) 서열식별번호: 11로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 23으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0230] (j) 서열식별번호: 12로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 24로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0231] (k) 서열식별번호: 13으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 25로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0232] (l) 서열식별번호: 14로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 26으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ; 또는
- [0233] (m) 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L .
- [0234] 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하고, 하기 각각에서의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분이 바람직하다:
- [0235] (a) 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0236] (b) 서열식별번호: 1144로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ; 또는
- [0237] (c) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L .
- [0238] 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하고, 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함

하는 V_L 각각에서의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분이 바람직하다.

- [0239] Ab 내의 CDR 도메인을 상술하는 상이한 방법이 개발되었다. 카바트 및 동료들의 접근법 (Wu 및 Kabat, 1970; Kabat et al., 1983)은 CDR이 Ab에 대부분의 가변 위치를 포함하고, 따라서 극히 제한된 수의 Ab 서열을 정렬함으로써 확인되고, 이어서 이용가능할 수 있다는 가정에 기초하였다. 이러한 정렬에 기초하여, 카바트 등은 초가변 영역 내의 잔기에 대해 넘버링 스킴을 도입하고, 어느 위치가 각각의 CDR의 처음과 끝을 마킹하는지를 결정하였다 (<http://bioinf.org.uk/abs/simkab.html>).
- [0240] 널리 사용되는 카바트 정의 이외에도, 카바트 정의의 결핍을 해결하고자 하는 코티아(Chothia) (Chothia et al., 1987; 1989; Al-Lazikani et al., 1997; <http://bioinf.org.uk/abs/chothia.html>), AbNum (Abhinandan and Martin, 2008; AbNum 참조; <http://www.bioinf.org.uk/abs/abnum/>에서 이용가능함), AbM (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>; Martin et al., 1989), 접촉 (<http://bioinf.org.uk/abs/>; MacCallum et al., 1996) 및 IMGT (Lefranc et al., 2003; <http://www.imgt.org>) 정의를 포함한 다른 정의가 사용되었다. Ab에 대한 구조적 정보가 이용가능하지 않을 때 개발되었음에도 불구하고, 카바트 정의가 CDR 도메인을 예측하는 데 가장 통상적으로 사용되는 방법이다.
- [0241] 명백하게 언급되지 않는 경우 및 문맥상 달리 나타내지 않는 한, 본원에 개시된 CDR은 카바트 정의를 사용하여 확인되었다. 카바트 방법을 사용하여 정의된 바와 같은 6개의 CDR 도메인에 대한 아미노산 서열, 뿐만 아니라 mAb 16B13, 14S15, 14S15h, 18Y12, 4A19, 2M18, 15C17, 13T20, 10R3, 8D55, 1V11, 11K16 및 12F27에 대한 V_H , V_L , 중쇄 및 경쇄에 대한 아미노산 서열이 표 10에 제시된다.
- [0242] 본 발명은 카바트 방법에 의해 정의된 바와 같은 하기 CDR 도메인을 포함하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb를 제공한다:
- [0243] (a) 서열식별번호: 27로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 28로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 29로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 30으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 31로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 32로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;
- [0244] (b) 서열식별번호: 33으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 34로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 35로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 36으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 37로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 38로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;
- [0245] (c) 서열식별번호: 39로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 40으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 41로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 42로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 43으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 44로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;
- [0246] (d) 서열식별번호: 45로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 46으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 47로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 48로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 49로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 50으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;
- [0247] (e) 서열식별번호: 51로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 52로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별

서열식별번호: 104로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 105로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 106으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 107로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 108로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.

[0256] 바람직한 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb는 카바트 방법에 의해 정의된 바와 같은 하기 CDR 도메인을 포함한다:

[0257] (a) 서열식별번호: 33으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 34로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 35로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 36으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 37로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 38로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;

[0258] (b) 서열식별번호: 103으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 104로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 105로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 106으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 107로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 108로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3; 또는

[0259] (c) 서열식별번호: 45로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 46으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 47로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 48로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 49로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 50으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.

[0260] 특정의 바람직한 실시양태에서, 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb는 카바트 방법에 의해 정의된 바와 같은 하기 CDR 도메인을 포함한다: 서열식별번호: 45로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 46으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 47로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 48로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 49로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 50으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.

[0261] 개시된 발명은 또한 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 포괄하고, 여기서 단리된 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 하기를 포함한다:

[0262] (a) 서열식별번호: 3으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 15로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

[0263] (b) 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

[0264] (c) 서열식별번호: 5로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 17로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

[0265] (d) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

[0266] (e) 서열식별번호: 7로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 19로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;

- [0267] (f) 서열식별번호: 8로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 20으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0268] (g) 서열식별번호: 9로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 21로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0269] (h) 서열식별번호: 10으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 22로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0270] (i) 서열식별번호: 11로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 23으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0271] (j) 서열식별번호: 12로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 24로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0272] (k) 서열식별번호: 13으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 25로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0273] (l) 서열식별번호: 14로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 26으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ; 또는
- [0274] (m) 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L .
- [0275] 바람직한 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분은 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하고, 하기를 포함한다:
- [0276] (a) 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ;
- [0277] (b) 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L ; 또는
- [0278] (c) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L .
- [0279] 바람직한 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분은 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하고, 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 을 포함한다.
- [0280] 상기 항-CCR8 Ab 중 임의의 것의 아미노산 서열과 고도로 유사하거나, 또는 상동성인 아미노산 서열을 갖는 V_H 및/또는 V_L 영역을 포함하고, 이들 Ab의 기능적 특성을 유지하는 항-CCR8 Ab가 또한 본 방법에서 사용하기에 적합하다. 예를 들어, 적합한 Ab는 각각 서열식별번호: 6 및/또는 18에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 각각 포함하는 V_H 및 V_L 영역을 포함하는 mAb를 포함한다. 추가 실시양태에서, V_H 및/또는 V_L 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 6 및/또는 18에 제시된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일성을 나타낸다. 본원에 사용된 바와 같이, 두 아미노산 서열 사이의 퍼센트 서열 동일성은 두 서열 사이의 서열 동일성 정도를 최대화시키기 위해 도입된, 임의의 갭의 수, 및 각 상기 갭의 길이를 고려하여, 비교되는 서열의 길이 대비 서열이 공유하는 동일한 위치의 수의 함수 (즉, % 동일성 = 동일한 위치의 수/비교되는 위치의 총 수 x 100)이다. 두 서열 사이의 서열 비교 및 퍼센트 동일성의 결정은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 널리 공지된 수학적 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다.

- [0281] 임의의 상기 항-CCR8 Ab의 아미노산 서열과 고도로 유사하거나 상동성이고 이들 Ab의 기능적 특성을 보유하는 아미노산 서열을 갖는 V_H 및 V_L 영역을 포함하는 항-CCR8 Ab가 개시되는 경우에, 이들은 적어도 1, 2, 3, 4, 5 개 또는 모든 6개의 CDR 내에서 100% 동일성 및 관련 전체 V_H 및/또는 V_L 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일성을 가질 수 있다.
- [0282] 예를 들어, 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분은 하기를 포함할 수 있다:
- [0283] (a) 서열식별번호: 4로 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일한 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일한 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L , 임의로 여기서 V_H 는 서열식별번호: 4 (서열식별번호: 33-35)에 대해 정의된 바와 같은 CDR 중 적어도 1, 2개 또는 모든 3개를 포함하고, V_H 는 서열식별번호: 16 (서열식별번호: 36-38)에 대해 정의된 바와 같은 CDR 중 적어도 1, 2개 또는 모든 3개를 포함함;
- [0284] (b) 서열식별번호: 115로 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일한 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일한 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L , 임의로 여기서 V_H 는 서열식별번호: 115 (서열식별번호: 103-105)에 대해 정의된 바와 같은 CDR 중 적어도 1, 2개 또는 모든 3개를 포함하고, V_L 은 서열식별번호: 116 (서열식별번호: 106-108)에 대해 정의된 바와 같은 CDR 중 적어도 1, 2개 또는 모든 3개를 포함함; 또는
- [0285] (c) 서열식별번호: 6으로 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일한 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일한 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L , 임의로 여기서 V_H 는 서열식별번호: 6 (서열식별번호: 45-47)에 대해 정의된 바와 같은 CDR 중 적어도 1, 2개 또는 모든 3개를 포함하고, V_L 은 서열식별번호: 18 (서열식별번호: 48-50)에 대해 정의된 바와 같은 CDR 중 적어도 1, 2개 또는 모든 3개를 포함함.
- [0286] 마찬가지로, 본원에 언급된 다른 단리된 Ab 중 임의의 것에 대해, Ab는 참조 V_H 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일한 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H , 및 참조 V_H 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일한 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 을 포함할 수 있고, 임의로 여기서 V_H 는 참조 V_H 서열에 대해 정의된 바와 같은 CDR 중 적어도 1, 2개 또는 모든 3개를 포함하고, V_L 은 참조 V_L 서열에 대해 정의된 바와 같은 CDR 중 적어도 1, 2개 또는 모든 3개를 포함한다.
- [0287] 본 발명은 임의로 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 추가로 포괄하고, 여기서 단리된 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 하기를 포함한다:
- [0288] (a) 서열식별번호: 99로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 111로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄;
- [0289] (b) 서열식별번호: 100으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 112로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄;
- [0290] (c) 서열식별번호: 101로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 113으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄;
- [0291] (d) 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄;
- [0292] (e) 서열식별번호: 117로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 118로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄; 또는
- [0293] (f) 서열식별번호: 110으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 119로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄.

- [0294] 임의로 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분이 바람직하고, 여기서 단리된 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 하기를 포함한다:
- [0295] (a) 서열식별번호: 100으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 112로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄;
- [0296] (b) 서열식별번호: 117로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 118로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄; 또는
- [0297] (c) 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄.
- [0298] 임의로 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분이 바람직하고, 여기서 단리된 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 하기를 포함한다:
- [0299] (a) 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄.
- [0300] 특정 실시양태에서, 본 발명의 단리된 항-CCR8 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 Ab 또는 그의 단편이다. 다른 실시양태에서, 그것은 인간화 Ab 또는 그의 단편이다. 추가 실시양태에서, 그것은 키메라 Ab 또는 그의 단편이다. 다른 실시양태에서, 단리된 항-CCR8 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 마우스 Ab 또는 그의 단편이다. 인간 대상체에게 투여를 위해, Ab는 바람직하게는, 키메라 Ab 또는 보다 바람직하게는, 인간화 또는 인간 Ab이다. 상기 키메라, 인간화, 인간 또는 마우스 mAb는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 의해 제조 및 단리될 수 있다.
- [0301] 본원에 개시된 항-CCR8 Ab는 또한 전장 Ab이외에도 ADCC를 매개할 수 있는 항원-결합 단편을 포함한다.
- [0302] 항-CCR8 면역접합체
- [0303] 또 다른 측면에서, 본 발명은 세포용해제, 예컨대 세포독소 또는 방사성 동위원소에 연결된, 본원에 개시된 단리된 항-hCCR8 Ab, 또는 그의 항원-결합 부분 중 어느 하나에 관한 것이다. 이러한 접합체는 본원에서 "면역접합체"로 지칭된다. 세포독소가 관련 기술분야에서 이용가능한 링커 기술을 사용하여 본 발명의 Ab에 접합될 수 있다. 방사선면역접합체를 제조하는 방법이 또한 관련 기술분야에 확립되어 있다.
- [0304] 이중특이적 분자
- [0305] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항-hCCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분과는 상이한 결합 특이성을 갖는 결합 도메인에 연결된, 본원에 개시된 단리된 항-hCCR8 mAb 중 어느 하나, 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 이중특이적 분자에 관한 것이다. 결합 도메인은 생성된 이중특이적 분자가 적어도 2종의 상이한 결합 부위 또는 표적 분자에 결합하도록 하는 기능적 분자 (예를 들어, 또 다른 Ab, Ab의 항원-결합 부분, 또는 수용체에 대한 리간드)일 수 있다.
- [0306] 항-hCCR8 mAb를 코딩하는 핵산 및 Ab를 발현하기 위한 용도
- [0307] 본 개시내용의 또 다른 측면은 본 발명의 단리된 항-hCCR8 Ab 중 임의의 것을 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본 개시내용은 본원에 기재된 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분 중 임의의 것을 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. "단리된" 핵산은 현저히 상이한, 즉, 자연상에 존재하는 것과 같은 핵산과 구별되는 화학적 정제, 성질 및 유용성을 갖는 핵산 조성물 물질을 지칭한다. 예를 들어, 단리된 DNA는 천연 DNA와는 달리, 천연 DNA의 독립적 부분이고, 자연계에서 발견되는, 보다 큰 구조적 복합체인 염색체의 내재성 부분이 아니다. 추가로, 천연 DNA와 달리, 단리된 DNA는 특히, 질환을 진단하거나 또는 치료제의 효능을 예측하기 위해 유전자 발현을 측정하고 바이오마커 유전자 또는 돌연변이를 검출하기 위한 PCR 프라이머 또는 혼성화 프로브로서 사용될 수 있다. 단리된 핵산은 또한 관련 기술분야에 널리 공지된 표준 기술을 사용하여 다른 세포 성분 또는 다른 오염물, 예를 들어, 다른 세포 핵산 또는 단백질이 실질적으로 없도록 정제될 수 있다.
- [0308] 본 발명의 핵산은 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 수득할 수 있다. 하이브리도마 (예를 들어, 실시예 8에 기재된 바와 같이 인간 Ig 유전자를 보유하는 트랜스제닉 마우스로부터 제조된 하이브리도마)에 의해 발현된 Ab의 경우, 하이브리도마에 의해 제조된 Ab의 경쇄 및 중쇄 또는 가변 영역을 코딩하는 cDNA는 표준 PCR 증폭 기술에 의해 수득될 수 있다. 일단 V_H 및 V_L 세그먼트를 코딩하는 DNA 단편을 수득하고 나면, 표준 재조합 DNA 기

술을 사용하여 이들 DNA 단편을 추가로 조작하여 예를 들어, 가변 영역 DNA를 전장 Ab쇄 유전자로, Fab 단편 유전자로, 또는 scFv 유전자로 전환시킬 수 있다. Ig 유전자 라이브러리로부터 수득된 Ab의 경우 (예를 들어, 파지 디스플레이 기술을 사용함), Ab를 코딩하는 핵산은 라이브러리로부터 회수될 수 있다.

[0309] 본 발명의 핵산은, 예를 들어, RNA 또는 DNA 예컨대 cDNA 또는 게놈 DNA일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 핵산은 cDNA이다.

[0310] 본 개시내용은 또한 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 본 개시내용은 추가로 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 진핵 세포, 및 가장 바람직하게는, 포유동물 숙주 세포가 Ab 발현을 위한 숙주 세포로서 바람직한데, 그 이유는 상기 진핵 세포, 및 특히 포유동물 세포가 원핵 세포보다, 적절히 폴딩되고 면역학적으로 활성을 띠는 Ab를 어셈블리하고, 분비할 수 있는 가능성이 더 크기 때문이다. 본 발명의 재조합 Ab를 발현하는 데 바람직한 포유동물 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 (Kaufman 및 Sharp, 1982), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다.

[0311] 숙주 세포는 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 제조하는 방법에 사용될 수 있으며, 상기 방법은 숙주 세포에서 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 발현하고, 숙주 세포로부터 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 단리하는 것을 포함한다. 숙주 세포는 생체외 또는 생체내에서 사용될 수 있다. Ab 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 DNA는 별개의 발현 벡터 내로 삽입될 수 있거나, 또는 보다 전형적으로는 둘 다가 동일한 벡터 내로 삽입된다. Ab의 V_H 및 V_L 세그먼트는 이들 가변 영역을 코딩하는 DNA를 이미 원하는 이소형의 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 코딩하는 발현 벡터로 삽입하여 V_H 세그먼트가 벡터 내의 C_H 세그먼트(들)에 작동가능하게 연결되고, V_L 세그먼트가 벡터 내의 C_L 세그먼트(들)에 작동가능하게 연결되도록 함으로써 임의의 이소형의 전장 Ab를 생성하는 데 사용될 수 있다. α -(1,6) 푸코실트랜스퍼라제 (FUT8) 효소가 결여된 세포주를 사용하여 그의 탄수화물 내에 푸코스가 결여된 mAb를 생산할 수 있다 (예를 들어, 미국 공개 번호 2004/0110704; 문헌 [Yamane-Ohnuki et al., 2004]; EP1176195 참조).

[0312] 본 발명의 또 다른 측면은 인간 Ig 중쇄 및 경쇄 트랜스진을 포함하고, 본원에 개시된 항-CCR8 HuMAb 중 임의의 것을 발현하는 것인 트랜스제닉 마우스에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 마우스로부터 제조된 HuMAb를 생산하는 하이브리도마를 포괄한다.

[0313] 치료적 항-CCR8 방법

[0314] 본 연구에서 생성된 항-hCCR8 Ab는 mCCR8에 결합하지 않기 때문에, 마우스 종양 모델에서 항암 약물로서의 항-CCR8의 효능을 시험하기 위해 마우스 항-mCCR8 mAb를 인간 또는 인간화 nf IgG1 항-hCCR8 mAb에 대한 대용물로서 사용하였다. 적절한 Ab 이소형의 선택은 마우스에서 ADCC/ADCP에 의한 CCR8-매개 종양 Treg 고갈을 증진시키는 데 사용될 수 있으며, 이는 주로 무린 종양에 풍부한 $Fc\gamma RIV^+$ 세포와 Ab의 상호작용에 의해 구동되는 것으로 입증되었다 (Nimmerjahn et al., 2010) (Simpson et al., 2013). 항-CCR8-mIgG2a로 지정된 마우스 IgG2a 이소형을 갖는 항-mCCR8 mAb를 인간 치료제로서 사용될 가능성이 있는 인간화 또는 인간 항-hCCR8 mAb에 대한 대용물로서 사용하였다. 항-CCR8-mIgG2a는 클론 SA214G2로서 바이오레전드에 의해 판매되는 상업용 래트 항-mCCR8 mAb로부터 유래되며, 이는 래트 IgG2b 이소형을 마우스 IgG2a 이소형으로 변화시키도록 변형되었다. 인간 항-hCCR8 mAb, A419 및 14S15와 같이, 항-CCR8-mIgG2a는 N-말단 결합제이고, 그의 mIgG2a 백본은 인간 nf 포맷과 유사한 ADCC 반응을 유도하기 위한 최대 $Fc\gamma R$ 결합을 제공한다.

[0315] 항-CCR8-mIgG2a는 시험된 여러 항-hCCR8 mAb의 높은 ADCC 잠재력 (실시에 17)과 유사한 높은 ADCC 잠재력을 갖고 (실시에 18), mCCR8-발현 세포에 대한 mCCL1의 결합을 차단하지만 (실시에 16), 시험된 여러 항-hCCR8 mAb보다 더 낮은 효력으로 hCCR8-발현 세포에 대한 hCCL1의 결합을 차단하는 (실시에 15) 것으로 입증되었다. 항-hCCR8 mAb는 또한 강력한 ADCC 활성을 나타낸다 (실시에 19 및 20). 항-CCR8-mIgG2a는 또한 개시된 특정 항-hCCR8 mAb보다 더 낮은 친화도로 mCCR8-발현 세포에 결합한다 (실시에 13). 이는 항-CCR8-mIgG2a가 마우스 모델에서 종양 성장의 억제에 대한 직접 연구에서 항-hCCR8 mAb에 대한 적합한 대용물임을 시사하지만, 항-hCCR8 Ab는 그의 동족 hCCR8 표적에 대한 보다 높은 친화도 결합, CCR8에 대한 CCL1 리간드의 결합을 차단하는 보다 높은 활성, 및 보다 높은 ADCC 잠재력을 고려하면 인간 대상체에서 종양 성장을 억제하는 데 훨씬 더 강력할 수 있다.

[0316] 다양한 동계 마우스 종양 모델을 사용하여 항-CCR8-mIgG2a 마우스 대용 mAb 단독 및 항-PD-1과 조합한 항종양 활성을 결정하였다. 항-CCR8-mIgG2a mAb-매개 Treg 고갈 및 후속적인 염증유발 반응 (CD8, CD4, 인터페론- γ ,

그랜자임B, 및 Ki67의 증가)은 CT26 및 MC38 결장 선암종 모델 및 SA1N 섬유육종 모델 (실시에 23-26 및 29 참조)을 포함한 면역원성 마우스 종양 모델에서 단일 작용제로서, 및 면역요법-저항성 모델, MB49 및 4T1에서 항-PD-1과 조합하여, 높은 백분율의 완전 종양 클리어런스로 강건한 종양 성장 억제를 유도하였다. 대조적으로, Fc-불활성 mIgG1-D265A 중쇄를 포함하는 변이체 Ab인 CCR8-mIgG1-D265A로의 처리 (Baudino et al., 2008)는 종양 퇴행에 대해 최소의 효과를 가졌다 (실시에 29 및 30). 항-CCR8 Ab 처리 시 Treg 고갈과 종양 효능 사이에 용량-의존적 관계가 있는지 여부를 결정하기 위해, 단일 용량 단독요법 연구를 MC38 모델에서 수행하였고, 용량-의존적 약동학/약역학/효능 관계를 관찰하였다 (실시에 26). 또한, 증가되고 적정가능한 CCL1 리간드 변화가 고갈 시 종양 상청액에서 관찰되었고 (데이터는 제시되지 않음), 이는 대용 바이오마커로서 작용할 수 있다.

[0317] MB49 마우스 방광 암종에서, 항-CCR8-mIgG2a는 오직 부분적인 항종양 활성만을 나타냈지만, 이는 항-PD-1 mAb의 활성보다 더 강했다 (실시에 27). 유사하게, 4T1 마우스 유방암 모델에서, 항-CCR8-mIgG2a는 또한 오직 부분적인 항종양 활성을 나타냈지만, 이 종양은 항-PD-1 mAb를 사용한 치료에 대해 완전히 저항성이었다 (실시에 28). 둘 다의 종양 모델에서, 항-CCR8-mIgG2a는 항-PD-1에 의해 유도되는 면역 반응을 강화시킴으로써, 항종양 반응의 효력의 현저한 증가를 생성한다. 2종의 Ab의 조합은 이들 난치성 종양 모델에서 종양 성장을 강하게 억제하는 데 있어서 상승작용적이다. 본원에서 Ab는 이들 Ab의 조합의 항종양 효능이 각각의 Ab에 의해 개별적으로 나타나는 항종양 효능의 합보다 더 큰 경우에 상승작용적으로 상호작용하는 것으로 간주된다.

[0318] 인간 종양 체외이식편 모델에서 종양 Treg-특이적 고갈은 또한 14S15, 16B13 및 4A19 mAb로의 처리시에 입증되었다 (실시에 20).

[0319] 단독요법으로서 항-CCR8 mAb를 사용한 암의 치료

[0320] 본원에 제공된 데이터는, 활성화된 Treg의 표면 상의 hCCR8에 고친화도로 결합하고 (EC_{50} = 약 0.1-2 nM; 실시에 11), 1차 활성화된 인간 Treg를 동종 활성화된 NK 세포와 공동-배양하는 시험관내 시스템에서 ADCC를 통해 Treg의 강력한 사멸을 유도하고 (EC_{50} = 약 10-60 pM; 실시에 19), 인간 종양 체외이식편 및 마우스 모델에서 CCR8⁺ 종양-침윤 Treg의 고갈을 특이적으로 매개하는 (실시에 20, 22 및 24) 항-hCCR8 mAb의 생성을 입증한다. 이들 mAb는 다양한 면역원성 및 면역요법-저항성 마우스 종양 모델에서 종양 성장의 강건한 억제를 나타내고 (실시에 23, 25, 27-29), 데이터는 암에 대한 신규 면역요법으로서, 단독요법으로서 또는 면역 체크포인트 차단과 조합하여 CCR8 고갈의 임상 평가를 강하게 뒷받침한다.

[0321] 따라서, 실시에에 제공된 데이터에 의해 뒷받침되는 바와 같이, 본 개시내용은 암을 앓고 있는 대상체에게 치료 유효량의 본원에 개시된 Treg-고갈 항-CCR8 Ab 중 어느 하나, 예를 들어 mAb, 면역접합체 또는 이중특이적 분자, 또는 상기 Ab, 예를 들어 항-CCR8 mAb, 면역접합체 또는 이중특이적 분자 중 어느 하나를 포함하는 제약 조성물을 투여하여 대상체를 치료하는 것을 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0322] 본 개시내용은 또한 대상체에게 치료 유효량의 본원에 개시된 Treg-고갈 항-CCR8 Ab 중 어느 하나, 예를 들어 mAb, 면역접합체 또는 이중특이적 분자, 또는 상기 항-CCR8 Ab, 예를 들어 mAb, 면역접합체 또는 이중특이적 분자 중 어느 하나를 포함하는 제약 조성물을 투여하여 대상체에서 종양 세포의 성장이 억제되도록 하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다.

[0323] 또 다른 항암제와 조합된 항-CCR8 Ab를 사용한 암의 치료

[0324] 본 개시내용은 암을 앓고 있는 대상체에게 치료 유효량의 (a) 본원에 개시된 Treg-고갈 항-CCR8 Ab, 면역접합체 또는 이중특이적 분자 중 어느 하나, 또는 상기 항-CCR8 Ab, 면역접합체 또는 이중특이적 분자 중 어느 하나를 포함하는 제약 조성물; 및 (b) 암을 치료하기 위한 추가의 치료제 (임의로, 여기서 추가의 치료제는 면역계의 억제를 감소시키거나 또는 자극을 증가시키는 화합물임)를 투여하여 대상체가 치료되도록 하는 것을 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0325] 본 개시내용은 또한 대상체에게 치료 유효량의 (a) 본원에 개시된 Treg-고갈 항-CCR8 Ab, 면역접합체 또는 이중특이적 분자 중 어느 하나, 또는 상기 항-CCR8 Ab, 면역접합체 또는 이중특이적 분자 중 어느 하나를 포함하는 제약 조성물; 및 (b) 암을 치료하기 위한 추가의 치료제를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 추가의 치료제는 면역계의 억제를 감소시키거나 또는 자극을 증가시켜 대상체에서 종양 세포의 성장이 억제되도록 하는 화합물이다.

[0326] 임의의 본 방법의 다른 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간 환자이다.

- [0327] Treg-매개 면역억제는 잠재적으로 면역-종양학에서 최적 항종양 면역 반응에 대한 주요 장애물이다. 암 면역요법에 의해 표적화된 많은 분자, 예컨대 PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, 및 TIGIT는 Treg 상에서 상향조절된다 (Kumar et al., 2018). 결과적으로, 이들 T 세포-기반 면역요법은 Treg 반응을 또한 증대시키는 잠재력을 갖는다. 예를 들어, PD-1 차단은 Treg 억제를 증진시키고 Treg 증식을 증가시킬 수 있고 (Kamada et al., 2019), 임상에서 항-CTLA-4 요법 후에 Treg 확장의 증거가 존재한다 (Kavanagh et al., 2008). 따라서, Treg-고갈 작용제는 단독요법으로서 항종양 반응을 개선시킬 뿐만 아니라, 본원에 개시된 바와 같이 다른 면역요법의 활성을 증진시킨다 (실시예 27 및 28 참조). 따라서, 본 개시내용은 암을 앓고 있는 대상체에서 치료제에 의해 도출되는 항종양 면역 반응을 강화시키는 방법을 제공하며, 여기서 치료제는 면역요법제, 예컨대 암 면역요법, 예컨대 PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3 또는 TIGIT에 특이적으로 결합하는 항체이다.
- [0328] 마우스 종양 모델에서, 강력한 조합 항종양 활성이 항-CCR8-mIgG2a 및 항-PD-1 둘 다로 처리된 마우스에서 관찰되었다 (실시예 27 및 28). 항-CCR8-단독요법 및 조합 치료에서 $CD8^+$ T 세포 빈도의 유사한 증가에도 불구하고, 이펙터 기능성을 증진시키기 위해 항-PD-1이 요구될 수 있다. 또한, 항-CCR8 처리가 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포 기억을 오래 지속되게 한다는 것이 입증되었다 (실시예 31). 이들 발견은 종종 항-PD1/PD-L1 요법에 대한 저항성을 발생시키고 (Jenkins et al., 2018) 높은 재발률을 나타내는 (Mahvi et al., 2018) 진행성 암의 치료에 대한 중요한 임상적 의의를 갖는다. 전체적으로, 이들 연구는 종양 Treg에 대한 CCR8의 특이성 및 표적화가능성을 강조하고, 단독요법으로서 또는 또 다른 면역요법, 예컨대 항-PD-1, 항-PD-L1 또는 항-CTLA-4와 조합하여 진행성 고형 종양의 치료에서 항-CCR8 고갈 Ab의 평가를 뒷받침한다.
- [0329] 개시된 방법의 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 면역계의 억제를 감소시키는 화합물이다. 예를 들어, 추가의 치료제는 소분자 화합물, 마크로시클릭 펩티드, 융합 단백질, 또는 Ab, 예를 들어 mAb일 수 있다. 추가 실시양태에서, 추가의 치료제는 프로그램화된 사멸-1 (PD-1), 프로그램화된 사멸 리간드-1 (PD-L1), 세포독성 T-림프구 항원-4 (CTLA-4), 림프구 활성화 유전자-3 (LAG-3), B 및 T 림프구 감쇠자 (BTLA), T 세포 이류노글로불린 및 뮤신 도메인-3 (TIM-3), 킬러 이류노글로불린-유사 수용체 (KIR), 킬러 세포 렉틴-유사 수용체 G1 (KLRG-1), 아데노신 A2a 수용체 (A2aR), Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT), T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제자 (VISTA), 원종양유전자 티로신-단백질 키나제 MER (MerTK), 자연 킬러 세포 수용체 2B4 (CD244) 또는 CD160에 특이적으로 결합하는 길항제, 예컨대 길항작용 mAb이다.
- [0330] 특정의 바람직한 실시양태에서, 추가의 치료제는 PD-1에 특이적으로 결합하는 길항작용 Ab 또는 그의 항원-결합 부분이다. 추가 실시양태에서, PD-1에 특이적으로 결합하는 Ab는 니볼루맙, 펌브롤리주맙, 세미폴리맙, 스파르탈리주맙, 캄렐리주맙, 신틸리맙, 티슬렐리주맙, 토리팔리맙, 도스탈리맙, 레티관리맙, 및 피미발리맙으로부터 선택되고, 예를 들어 니볼루맙, 펌브롤리주맙, 세미폴리맙, 스파르탈리주맙, 캄렐리주맙, 신틸리맙, 티슬렐리주맙으로부터 선택되고, 예를 들어 토리팔리맙, 예를 들어 니볼루맙 및 펌브롤리주맙으로부터 선택된다.
- [0331] 다른 바람직한 실시양태에서, 추가의 치료제는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 길항작용 Ab 또는 그의 항원-결합 부분이다. 추가 실시양태에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 Ab는 아테졸리주맙, 두르발루맙, 아벨루맙, 엔바폴리맙, BMS-936559, CK-301, CS-1001, SHR-1316, CBT-502, BGB-A333, 및 KN035로부터 선택되고, 예를 들어 아테졸리주맙, 두르발루맙, 아벨루맙, 엔바폴리맙, BMS-936559, CK-301, CS-1001, SHR-1316, CBT-502, BGB-A333으로부터 선택되고, 예를 들어 아테졸리주맙, 두르발루맙 및 아벨루맙으로부터 선택된다.
- [0332] 다른 바람직한 실시양태에서, 추가의 치료제는 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 길항작용 Ab 또는 그의 항원-결합 부분이다. 추가 실시양태에서, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 Ab는 이필리무맙 또는 트레멜리무맙이고, 예를 들어 이필리무맙으로부터 선택된다.
- [0333] 본 개시내용은 암을 앓고 있는 대상체에게 치료 유효량의 본원에 개시된 Treg-고갈 항-CCR8 Ab, 면역접합체 또는 이중특이적 분자 중 어느 하나, 또는 상기 항-CCR8 Ab, 면역접합체 또는 이중특이적 분자 중 어느 하나를 포함하는 제약 조성물을 투여하여, 대상체가 치료제 단독에 의해 유발된 면역 반응과 비교하여 암에 대해 더 강한 면역 반응을 경험하도록 하는 것을 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체에서 치료제에 의해 유발된 항종양 면역 반응을 강화시키는 방법을 추가로 제공한다. 이러한 방법의 특정의 바람직한 실시양태에서, 치료제는 체크포인트 억제제, 예를 들어 항-PD-1, 항-PD-L1 또는 항-CTLA-4 mAb이다. 이러한 방법의 특정의 바람직한 실시양태에서, 치료제는 항-PD-1 Ab 니볼루맙이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 치료제는 항-PD-1 Ab 펌브롤리주맙이다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 치료제는 항-PD-L1 Ab 아테졸리주맙이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 치료제는 항-PD-L1 Ab 두르발루맙이다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 치료제는 항-PD-L1 Ab 아벨루맙이다. 이러한 방

법의 특정의 바람직한 실시양태에서, 치료제는 항-CTLA-4 Ab 이필리무맙이다. 특정의 다른 실시양태에서, 치료제는 방사선요법이다.

[0334] 개시된 방법에 의해 치료가능한 암

[0335] 암 세포를 공격 및 파괴하는 사실상 면역계의 무한한 유연성을 사용하는 것에 의존하는 면역-종양학은 매우 광범위한 암을 치료하는 데 적용가능하다 (예를 들어, 문헌 [Yao et al., 2013; Callahan et al., 2016; Pianko et al., 2017; Farkona et al., 2016; Kamta et al., 2017] 참조). 예를 들어, 항-PD-1 Ab인 니볼루맙은 다수의 상이한 유형의 암을 치료하는 데 효과적인 것으로 제시되었으며 (예를 들어, 문헌 [Brahmer et al., 2015; Guo et al., 2017; Pianko et al., 2017]; WO 2013/173223 참조), 이는 현재 다수의 고형암 및 혈액암에서 임상 시험 중에 있다. 따라서, 종양-침윤 Treg의 CCR8-매개 고갈을 단독요법으로서 또는 또 다른 면역요법, 예컨대 면역 체크포인트 억제와 조합하여 사용하는 개시된 방법은 매우 다양한 고형 및 액상 종양 둘 다를 치료하는 데 적용가능하다.

[0336] 치료 가능한 광범위한 스펙트럼의 암

[0337] 본원에 개시된 암 치료 방법에 사용된 Ab는 암 세포를 직접적으로 표적화하지 않고, 대신, 면역억제제 Treg를, 임의로 암 세포를 공격하고 파괴하는 데 있어서 면역계를 용이하게 하는 면역 체크포인트 억제와 조합하여 고갈 시킴으로써 면역계를 표적화 및 증진시키기 때문에, 이들 Ab는 광범위한 암의 치료에 적용가능하다. 다양한 암 치료에서의 니볼루맙의 효능은 이미 진행성 흑색종, 진행성 비소세포 폐암, 전이성 신세포 암종, 전형적 호지킨 림프종, 두경부의 진행성 편평 세포 암종, 전이성 요로상피 암종, MSI-H 또는 dMMR 전이성 결장직장암, 간세포성 암종, 소세포 폐암, 및 식도 편평 세포 암종 (Drugs.com - Opdivo Approval History: <https://www.drugs.com/history/opdivo.html>)을 치료하기 위한 상기 약물의 승인에 의해 입증된 것으로 나타났으며, 다수의 다른 암에서의 임상 시험이 진행 중이다. 유사하게, 항-PD-L1 약물, 예컨대 아테졸리주맙 (테센트릭(TECENTRIQ)®), 두르발루맙 (임핀지(IMFINZI)®) 및 아벨루맙 (바벤시오(BAVENCIO)®)은 다양한 적응증에서 승인되었다. 따라서, 매우 다양한 상이한 암이 항-CCR8 Ab, 및 임의로 항-CCR8 및 항-PD-1/PD-L1 Ab의 조합을 사용하여 치료가능하다. 이러한 치료제 조합에 대해 입증된 높은 효능으로 많은 미충족 의료 필요에 시달린 암에 집중할 수 있게 되었다.

[0338] 특정 실시양태에서, 개시된 암 요법 방법은 고형 종양인 암을 치료하는 데 광범위하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 고형 종양은 편평 세포 암종, 소세포 폐암 (SCLC), 비소세포 폐암 (NSCLC), 편평 NSCLC, 비-편평 NSCLC, 두경부암, 유방암, 식도암, 위암, 위장암, 소장암, 간암, 간세포성 암종 (HCC), 췌장암 (PAC), 신장암, 신세포 암종 (RCC), 방광암, 요도암, 요관암, 결장직장암 (CRC), 결장암, 결장 암종, 항문부암, 자궁내막암, 전립선암, 섬유육종, 신경모세포종, 신경교종, 교모세포종, 배세포 종양, 소아 육종, 부비동비강 자연 킬러, 흑색종, 피부암, 골암, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막 암종, 난관 암종, 난소암, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 고환암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연부 조직 육종, 음경암, 신우 암종, 중추 신경계 (CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척수축 종양, 뇌암, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피양암, 편평 세포암, 소아기 고형 종양, 환경적으로 유발된 암, 바이러스-관련 암, 바이러스 기원의 암, 진행성 암, 절제불가능한 암, 전이성 암, 불응성 암, 재발성 암 및 그의 임의의 조합으로부터 선택된 암이다. 특정 실시양태에서, 암은 진행성, 절제불가능, 전이성, 불응성 암, 및/또는 재발성 암이다.

[0339] 마우스 모델에서 항-CCR8을 사용한 상이한 암의 유효 치료의 입증에 기초하여 (실시예 23-29), 특정 종양 유형은 항-CCR8 Ab를 사용한 치료에 특히 적용가능한 것으로 예상된다. 따라서, 특정 실시양태에서, 고형 종양은 결장 선암종, 방광 암종, 유방 암종 및 섬유육종으로부터 선택된 암이다. 항-CCR8이 항-PD-1이 효능을 거의 나타내지 않는 마우스 모델, 예컨대 MB49 방광암 모델 (실시예 27) 및 4T1 유방암 모델 (실시예 28)에서 종양을 수축시키는 데 효과적이라는 발견은 항-CCR8이 암을 치료하는 데 있어서 매우 광범위하게 적용가능하고, 항-PD-1보다 더 폭넓게 효과적일 수 있으며, 항-CCR8과 체크포인트 차단, 예를 들어 항-PD-1, 항-PD-L1 또는 항-CTLA-4의 조합이 다양한 암을 치료하는 데 훨씬 더 광범위하게 적용될 수 있다는 것을 시사한다.

[0340] CCR8⁺ Treg의 차등 유전자 발현 분석을 위해 인간 종양에 대해 단일-세포 RNA-seq 분석을 수행하였다 (실시예 32). CCR8 및 CD8A의 비교적 높은 발현, 및 그의 높은 CCR8/CD8A 비는, 두경부 편평 세포 암종 (HNSC), 폐 선암종 (LUAD), 위 선암종 (STAD), 폐 편평 세포 암종 (LUSC), 췌장 선암종 (PAAD), 직장 선암종 (READ), 식도 암종 (ESCA), 유방 침습성 암종 (BRCA), 결장 선암종 (COAD) 및 자궁경부 편평 세포 암종 및 자궁내막 선암종 (CESC)을 항-CCR8 Ab를 사용한 치료에 특히 적용가능한 것으로 예상되는 종양 유형으로서 확인시켜 준다. 따라서, 특정 실시양태에서, 고형 종양은 항-CCR8 Ab로의 치료에 특히 적용가능한 것으로 예상되는 종양 유형으로서

HNSC, LUAD, STAD, LUSC, PAAD, READ, ESCA, BRCA, COAD, CESC, 여포성 림프종, 급성 림프구성 백혈병 및 림프종으로부터 선택된 암이다.

[0341] 포르말린-고정, 파라핀-포매 (FFPE) 조직 샘플 상에서 IHC에 의해 17종의 종양 유형 또는 하위유형에서 평가된 CCR8 발현은 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC; 본원에서 두경부의 편평 세포 암종 [SCCHN]으로도 지칭됨)에서 풍부하고, 다형성 교모세포종 (GBM; 실시예 33)에서는 제일 덜 풍부한 것으로 밝혀졌다. 높은 수준의 CCR8을 발현하는 종양이 항-CCR8 Ab를 사용한 치료에 반응할 가능성이 더 크다는 것에 기초하여, 이들 종양 프로파일링 데이터는 항-CCR8 요법에 대한 HNSCC, 자궁경부암, CRC, 비소세포 폐암-편평 세포 암종 (NSCLC-SCC), NSCLC-선암종 (NSCLC-ADC), 췌장암, 위암, 방광암 및 유방암의 우선순위화를 뒷받침한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 고형 종양은 HNSCC, 자궁경부암, CRC, NSCLC-SCC, NSCLC-ADC, 췌장암, 위암, 방광암 및 유방암으로부터 선택된 암이다.

[0342] 특정 실시양태에서, 본 요법 방법은 혈액 악성종양인 암을 치료하는 데 사용될 수 있다. 혈액 악성종양은 모든 유형의 백혈병, 림프종, 및 골수종을 포함한, 2종의 주요 혈액 세포 계통, 즉, (과립구, 적혈구, 혈전구, 대식세포 및 비만 세포를 생산하는) 골수 세포주, 또는 (B, T, NK 및 형질 세포를 생산하는) 림프성 세포주로부터 유래된 액상 종양을 포함한다. 본 요법 방법을 사용하여 치료될 수 있는 혈액 악성종양은 예를 들어 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 급성 골수 백혈병 (AML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 만성 골수 백혈병 (CML), 호지킨 림프종 (HL), 비-호지킨 림프종 (NHL), 다발성 골수종, 무증상 골수종, 의미 불명의 모노클로날 감마글로불린병증 (MGUS), 진행성, 전이성, 불응성 및/또는 재발성 혈액 악성종양, 및 상기 혈액 악성종양의 임의의 조합으로부터 선택된 암을 포함한다.

[0343] TARGET (Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments, <https://ocg.cancer.gov/programs/target>) 분석은 또한, 검사된 혈액 악성종양 중에서, 여포성 림프종, 급성 림프구성 백혈병 및 림프종이 CCR8의 가장 높은 상대 발현을 갖는 것으로 밝혀졌고, 항-CCR8 mAb로의 치료에 대해 우선시되어야 함을 나타냈다 (실시예 32). 따라서, 본 발명의 치료 방법의 특정 실시양태에서, 혈액 악성종양은 여포성 림프종 또는 급성 림프구성 백혈병 및 림프종이다.

[0344] 특정의 다른 실시양태에서, 혈액 악성종양은 급성, 만성, 림프구성 (림프모구성) 및/또는 골수 백혈병, 예컨대 ALL, AML, CLL 및 CML; 림프종, 예컨대 HL, NHL (이 중 약 85%는 B 세포 림프종임), 예컨대 미만성 대 B-세포 림프종 (DLBCL), 여포성 림프종 (FL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL)/소림프구성 림프종 (SLL), 외투 세포 림프종, 변연부 B-세포 림프종 (점막-연관 림프성 조직 (MALT) 림프종, 결절성 변연부 B-세포 림프종, 및 비장 변연부 B-세포 림프종), 버킷 림프종, 림프형질세포양 림프종 (LPL; 또한 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (WM) 으로서 공지됨), 모발상 세포 림프종, 및 원발성 중추 신경계 (CNS) 림프종, T 세포 림프종인 NHL, 예를 들어 전구체 T-림프모구성 림프종/백혈병, T-림프모구성 림프종/백혈병 (T-Lbly/T-ALL), 말초 T-세포 림프종, 예컨대 피부 T-세포 림프종 (CTLC, 즉 균상 식육종, 세자리 증후군 등), 성인 T-세포 림프종/백혈병, 혈관면역모세포성 T-세포 림프종, 림프절외 자연 킬러/T-세포 림프종 비강형, 장병증-연관 장 T-세포 림프종 (EATL), 역형성 대세포 림프종 (ALCL), 및 상세불명의 말초 T-세포 림프종, 급성 골수성 림프종, 림프형질세포양 림프종, 단핵구성 B 세포 림프종, 혈관중심성 림프종, 장 T-세포 림프종, 원발성 중격 B-세포 림프종, 이식후 림프증식성 장애, 진성 조직구성 림프종, 원발성 삼출 림프종, 미만성 조직구성 림프종 (DHL), 면역모세포성 대세포 림프종, 및 전구체 B-림프모구성 림프종; 골수종, 예컨대 다발성 골수종, 무증상 골수종 (무통성 골수종으로도 불림), 의미 불명의 모노클로날 감마글로불린병증 (MGUS), 고립 형질세포종, IgG 골수종, 경쇄 골수종, 비분비성 골수종, 및 아밀로이드증; 및 상기 혈액 악성종양의 임의의 조합으로부터 선택된 암이다.

[0345] 추가 실시양태에서, 혈액 악성종양은 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 급성 골수 백혈병 (AML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 만성 골수 백혈병 (CML), T 세포 림프종, 호지킨 림프종 (HL), 비-호지킨 림프종 (NHL), 다발성 골수종, 무증상 골수종, 의미 불명의 모노클로날 감마글로불린병증 (MGUS), 진행성, 전이성, 불응성 및/또는 재발성 혈액 악성종양, 및 상기 혈액 악성종양의 임의의 조합으로부터 선택된다.

[0346] 본 방법은 또한 진행성, 전이성, 불응성 및/또는 재발성 혈액 악성종양의 치료에도 적용가능하다.

[0347] 암을 치료하는 데 있어서 항-CCR8의 임상 시험을 위해 (실시예 34), 특정 고형 종양을 상기 언급된 상이한 전임상 연구의 결과에 기초하여 선택하였다: 마우스 종양 모델에서 항-CCR8의 입증된 효능 (실시예 23-29); CCR8의 비교적 높은 발현 및 CD8A 발현에 대한 풍부화를 갖는 종양 유형을 확인하는, 문헌 [Cancer Genome Atlas (National Cancer Institute, 2021)]에 나타난 33종의 종양 유형에서의 CCR8 및 CD8A의 RNA 발현 (실시예 32); 및 IHC에 의해 측정된 바와 같은 17종의 종양 유형 또는 하위유형에서의 CCR8 발현 수준 (실시예 33). 선택된

종양 유형은 NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, 위/위식도 (GE) 접합부 선암종, 및 자궁경부암 (편평 세포 암종 [SCC] 또는 선암종)이다. 진행성 종양에 대해 제한된 데이터가 이용가능하지만, 이러한 선택은 NSCLC, CRC, 위암 및 자궁경부암에서의 악화된 예후와 상관관계가 있는 높은 CCR8 발현 수준 또는 Treg의 존재에 의해 뒷받침된다 (Shah et al., 2011; Yi et al., 2018; Zhao et al., 2016; Tao et al., 2012; Xu et al., 2020). SCCHN에 대한 예후에 대한 보고는 아마도 부분적으로 Treg의 존재를 검출하기 위해 사용되는 다양한 방법 및 분자 마커 때문에 엇갈린다 (Saleh et al., 2020). 따라서, 개시된 암 치료 방법의 특정 실시양태에서, 고형 종양은 NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, 위/GE 접합부 암 및 자궁경부암으로부터 선택된 암이다. 특성의 바람직한 실시양태에서, 고형 종양은 NSCLC이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 고형 종양은 SCCHN이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 고형 종양은 MSS-CRC이다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 고형 종양은 위/GE 접합부 암이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 고형 종양은 자궁경부암이다.

- [0348] 항-CCR8 및 항-PD-1/항-PD-L1 Ab의 의학적 용도
- [0349] 본 개시내용은 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에서 사용하기 위한 단리된 항-CCR8 Ab, 바람직하게는 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다. 본 개시내용은 이중 Treg 고갈 및 체크포인트 경로, 예를 들어 PD-1/PD-L1 신호전달 경로의 차단을 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에서 조합하여 사용하기 위한 단리된 항-CCR8 Ab, 바람직하게는 mAb 또는 그의 항원-결합 부분 및 체크포인트 억제제 예컨대 단리된 항-PD-1/항-PD-L1 Ab, 바람직하게는 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 추가로 제공한다. 항-CCR8 Ab는 본원에 개시된 전체 범위의 암 치료를 위해 단독요법으로서 또는 체크포인트 억제제, 예컨대 항-PD-1/항-PD-L1 Ab와 조합하여 사용될 수 있다.
- [0350] 개시된 발명의 한 측면은 암을 앓고 있는 대상체 치료용 의약의 제조를 위한 본 발명의 단리된 항-CCR8 Ab 또는 그의 항원-결합 부분의 용도를 포함한다. 항-CCR8 Ab는 암 환자 치료용 의약의 제조를 위해 단독으로 또는 체크포인트 억제제 예컨대 단리된 항-PD-1/항-PD-L1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분과 조합하여 사용될 수 있다. 의약의 제조를 위한 임의의 상기 항-CCR8 Ab 및 항-PD-1/항-PD-L1 Ab의 용도는 본원에 개시된 전체 범위의 암에 광범위하게 적용될 수 있다.
- [0351] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 상기 치료제 조합을 사용하는 치료 방법의 모든 실시양태에 상응하는 암 치료 방법에서 사용하기 위한, 체크포인트 억제제 예컨대 단리된 항-PD-1/항-PD-L1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분과 조합된 항-CCR8 Ab 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다.
- [0352] 개시된 치료 방법에 사용하기에 적합한 항-CCR8 Ab
- [0353] 개시된 방법에 사용하기에 적합한 항-CCR8 Ab는 세포의 표면 상에 발현된 CCR8에 높은 특이성 및 친화도로 특이적으로 결합하고 ADCC에 의한 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb 또는 그의 항원-결합 부분이다. 이러한 Ab는 치료 효능에 중요한 하나 이상의 특성을 나타낸다. 특히, 단리된 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 하기 특성 중 적어도 하나를 나타낸다:
- [0354] (a) 약 20 nM 이하, 바람직하게는 약 2 nM 이하, 바람직하게는 약 1 nM 이하의 EC_{50} 으로 세포의 표면 상에 발현된 CCR8에 특이적으로 결합함;
- [0355] (b) 흉선의 수질 및 피부의 진피에서 회귀하고 산란된 면역 세포에 특이적으로 결합하지만, 예를 들어 인간 대뇌, 소뇌, 심장, 간, 폐, 신장, 편도, 비장, 흉선, 결장, 위, 췌장, 부신, 뇌하수체, 피부, 말초 신경, 고환 또는 자궁 조직, 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에는 결합하지 않음. 예를 들어, 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 종양-침윤 Treg에 특이적으로 결합하지만 PBMC에는 결합하지 않을 수 있으며, 예를 들어 고정된 PBMC에서 세포질 염색을 나타내지 않을 수 있음. 상기 언급된 목록의 세포 및 조직에 대한 Ab의 비-결합은, 예를 들어 고정된 조직 샘플 상에서, 예를 들어 실시예 14에 기재된 방법에 의해, 예를 들어 관련 Ab로의 표준 염색을 수행함으로써 확립될 수 있음;
- [0356] (c) CCR8에 대한 CCL1의 결합을 억제하고, CCR8/CCL1 신호전달을 약 5 nM 이하의 IC_{50} 으로 억제함;
- [0357] (d) 세포의 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때, 약 100 pM 이하, 바람직하게는 약 60 pM 이하, 바람직하게는 약 40 pM 이하, 보다 바람직하게는 약 13 pM 이하, 보다 바람직하게는 10 pM 이하의 EC_{50} 으로 세포의 고갈을 매개함;
- [0358] (e) 세포의 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때 가교 Ab의 존재 또는 부재 하에 CCR8의 내재화를 유발하지 않음;

- [0359] (f) 대상체에게 단독요법으로서 투여되는 경우에 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제함; 및
- [0360] (g) 암을 치료하기 위한 추가의 치료제와 조합하여 대상체에게 투여되는 경우에 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하며, 임의로 여기서 추가의 치료제는 면역 체크포인트 억제제이고, 임의로 여기서 체크포인트 억제제는 항-PD-1, 항-PD-L1 또는 항-CTLA-4 Ab임.
- [0361] 특정 실시양태에서, 단리된 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 상기 언급된 특성 중 적어도 2 또는 3개, 바람직하게는 4, 5 또는 6개를 나타낸다. 보다 바람직한 실시양태에서, 단리된 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 상기 언급된 특성 모두를 나타낸다. 예를 들어, 특성의 바람직한 실시양태에서, 단리된 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은:
- [0362] (a) 약 20 nM 이하, 바람직하게는 약 2 nM 이하, 바람직하게는 약 1 nM 이하의 EC_{50} 으로 세포의 표면 상에 발현된 CCR8에 특이적으로 결합하고;
- [0363] (b) 세포의 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때, 약 100 pM 이하, 약 60 pM 이하, 바람직하게는 약 40 pM 이하, 보다 바람직하게는 약 13 pM 이하, 보다 바람직하게는 10 pM 이하의 EC_{50} 으로 세포의 고갈을 매개하고;
- [0364] (c) 대상체에게 단독요법으로서 투여되는 경우에 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하고;
- [0365] (d) 암을 치료하기 위한 추가의 치료제와 조합하여 대상체에게 투여되는 경우에 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하며, 임의로 여기서 추가의 치료제는 체크포인트 억제제이다.
- [0366] 다른 바람직한 실시양태에서, 단리된 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은:
- [0367] (a) 세포의 표면 상에 발현된 CCR8에 약 2 nM 이하의 EC_{50} 으로 특이적으로 결합하고;
- [0368] (b) 세포의 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때 약 40 pM 이하의 EC_{50} 으로 세포의 고갈을 매개하고;
- [0369] (c) 암을 치료하기 위한 추가의 치료제와 조합하여 대상체에게 투여되는 경우에 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하며, 임의로 여기서 추가의 치료제는 항-PD-1, 항-PD-L1 또는 항-CTLA-4 Ab이다.
- [0370] 특정 실시양태에서, 상기 언급된 기능적 특성 중 하나 이상, 최대 모두를 나타내는 단리된 Ab, 예를 들어 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 추가로 hCCR8의 N-말단 도메인에 위치한 에피토프에 약 10 nM 이하의 K_D 로 결합하며, 여기서 에피토프는 서열 $Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}$ (서열식별번호: 2) 및 황산화 tyr-15 및/또는 tyr-17 잔기를 갖는 펩티드를 포함한다. 특성의 다른 실시양태에서, 상기 언급된 기능적 특성 중 하나 이상, 최대 모두를 나타내는 단리된 Ab, 예를 들어 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 추가로 인간 CCR8의 N-말단 도메인에 위치한 에피토프에 약 10 nM 이하의 K_D 로 결합하며, 여기서 에피토프는 서열 $V_{12}T_{13}D_{14}Y_{15}Y_{16}Y_{17}P_{18}D_{19}I_{20}F_{21}S_{22}$ (서열식별번호: 109) 및 황산화 tyr-15 및 tyr-17 잔기를 갖는 펩티드를 포함한다.
- [0371] 특정 실시양태에서, 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 각각에서 상기 특성을 가질 수 있고/거나 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 카바트 방법에 의해 정의된 바와 같은 하기 CDR을 포함할 수 있다: 서열식별번호: 33으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 34로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 35로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 36으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 37로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 38로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3. 또 다른 예로서, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 를 포함할 수 있다. 추가의 예로서, 이러한 Ab는 서열식별번호: 100으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 112로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 임의로, Ab는 그의 중쇄의 감소된 푸코실화를 갖거나, 또는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 저푸코실화 또는 비푸코실화 중쇄 불변 영역을 갖는다.

[0372] 특정 실시양태에서, 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 각각에서 상기 특성을 가질 수 있고/거나 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 카바트 방법에 의해 정의된 바와 같은 하기 CDR을 포함할 수 있다: 서열식별번호: 103으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 104로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 105로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 106으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 107로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 108로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3. 또 다른 예로서, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 을 포함할 수 있다. 추가의 예로서, 이러한 Ab는 서열식별번호: 117로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 118로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 임의로, Ab는 그의 중쇄의 감소된 푸코실화를 갖거나, 또는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 저푸코실화 또는 비푸코실화 중쇄 불변 영역을 갖는다.

[0373] 특정 실시양태에서, 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 각각에서 상기 특성을 가질 수 있고/거나 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 45로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 46으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 47로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 48로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 49로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 50으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 을 포함할 수 있다. 추가적인 예에서, 이러한 Ab는 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 임의로, Ab는 그의 중쇄의 감소된 푸코실화를 갖거나, 또는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 저푸코실화 또는 비푸코실화 중쇄 불변 영역을 갖는다.

[0374] 조합 요법

[0375] 인간 CCR8⁺ Treg는 또한 PD-1을 높은 수준으로 공동-발현한다 (데이터는 제시되지 않음). 항-PD-1 mAb로의 치료는 PD-1⁺ Treg를 활성화시킬 수 있으며, 이는 잠재적으로 위암을 갖는 니볼루맵-치료된 환자에서 과다진행 또는 1차 저항성을 설명한다 (Kamada et al., 2019). 따라서, Treg 고갈은 항-PD-1 요법에 대한 전체 반응률을 개선시킬 가능성이 있다. 이러한 조합은 또한 항-CCR8과 항-PD-1의 상승작용적 효과가 MB49 및 4T-1 종양 모델에서 관찰된 전임상 마우스 연구 (실시예 27 및 28)에 의해 뒷받침된다.

[0376] 항-CCR8 Ab 및 체크포인트 억제제를 사용한 조합 요법의 효능이 항-PD-1 Ab를 사용하여 본원에서 입증되었지만, T 세포 반응을 조절하는 여러 다른 공동자극 및 억제 수용체 및 리간드가 확인되었다. 자극 수용체의 예는 유도성 T 세포 공동-자극인자 (ICOS), CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), CD27, 글루코코르티코이드-유도된 TNFR-관련 단백질 (GITR) 및 헤르페스바이러스 진입 매개체 (HVEM)를 포함하고, 반면에 PD-1/PD-L1 이외의 억제 수용체의 예는 세포독성 T-림프구-연관 단백질 4 (CTLA-4), B 및 T 림프구 감쇠자 (BTLA), T 세포 이뮤노글로불린 및 뮤신 도메인-3 (TIM-3), 림프구 활성화 유전자-3 (LAG-3), 킬러 이뮤노글로불린-유사 수용체 (KIR), 아데노신 A2a 수용체 (A2aR), 킬러 세포 렉틴-유사 수용체 G1 (KLRG-1), 자연 킬러 세포 수용체 2B4 (CD244), CD160, Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT), 및 T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제자 (VISTA)에 대한 수

용체를 포함한다 (Mellman et al., 2011; Pardoll, 2012; Baitsch et al., 2012). 이들 수용체 및 그의 리간드는 면역 반응의 억제제를 자극하거나 방지하여 종양 세포를 공격하도록 설계된 치료제를 위한 표적을 제공한다 (Weber, 2010; Mellman et al., 2011; Pardoll, 2012). 자극 수용체 또는 수용체 리간드는 효능제 작용제에 의해 표적화되는 반면에, 억제 수용체 또는 수용체 리간드는 차단제에 의해 표적화된다. 많은 면역 체크포인트가 리간드-수용체 상호작용에 의해 개시되기 때문에, 이들은 Ab에 의해 용이하게 차단될 수 있거나 또는 재조합 형태의 리간드 또는 수용체에 의해 조정될 수 있다. PD-1/PD-L1 이외의 T 세포 반응을 조절하는 공동자극 및 억제 수용체 및 리간드 중 1종 이상은 종양 성장을 억제하기 위해 본원에 개시된 항-CCR8 Ab와 상승작용하기 위한 표적을 제공할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 항-CCR8 Ab는 항-CTLA-4 Ab와 조합된다. 다른 실시양태에서, 항-CCR8 Ab는 항-LAG-3 Ab와 조합된다.

[0377] 방사선요법은 뮌린 모델 (Muroyama et al., 2017) 및 인간 (미공개 데이터)에서 치료 후 Treg 침윤의 증가로 이어진다. 증가된 Treg 침윤은 항종양 면역의 바람직하지 않은 억제로 이어질 수 있고, CCR8-매개 고갈은 방사선요법의 효능을 강화시킬 수 있다.

[0378] 본 개시내용은 체크포인트 억제 또는 방사선요법과 같은 치료의 항종양 효능을 증진시킴으로써 면역 반응을 강화시키는 데 효과적이고, 하기 바람직한 특징 중 적어도 하나, 몇몇 또는 모두를 나타내는 항-CCR8 mAb를 제공한다: (a) 약 1 nM 이하의 EC_{50} 으로 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합함; (b) 흉선의 수질 및 피부의 진피에서 희귀하고 산란된 면역 세포에 특이적으로 결합하지만, 예를 들어 인간 대뇌, 소뇌, 심장, 간, 폐, 신장, 편도, 비장, 흉선, 결장, 위, 췌장, 부신, 뇌하수체, 피부, 말초 신경, 고환 또는 자궁 조직, 또는 PBMC에는 결합하지 않음. 예를 들어, 항-CCR8 mAb 또는 그의 항원-결합 부분은 종양-침윤 Treg에 특이적으로 결합하지만 PBMC에는 결합하지 않을 수 있으며, 예를 들어 고정된 PBMC에서 세포질 염색을 나타내지 않을 수 있음. 상기 언급된 세포 및 조직의 목록에 대한 Ab의 비-결합은, 예를 들어 관련 Ab로의 표준 염색을, 예를 들어 실시예 14에 기재된 방법에 의해, 예를 들어 고정된 조직 샘플 상에서 수행함으로써 확립될 수 있음; (c) CCR8에 대한 CCL1의 결합을 억제하고 CCR8/CCL1 신호전달을 약 5 nM 이하의 IC_{50} 으로 억제함; (d) 세포 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때 세포의 고갈을 약 50 pM 이하의 EC_{50} 으로 매개함; (e) 세포 표면 상의 CCR8에 결합되었을 때 가교 Ab의 존재 또는 부재 하에 CCR8의 내재화를 유발하지 않음; (f) 대상체에게 단독요법으로서 투여되었을 때 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제함; 및 (g) 대상체에게 암을 치료하기 위한 추가의 치료제와 조합하여 투여되었을 때 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하며, 임의로 여기서 추가의 치료제는 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA-4 Ab임.

[0379] 본원에 기재된 치료 방법, 조성물 또는 키트에 사용될 수 있는 특정 항-CCR8 mAb는 세포 표면 상의 hCCR8에 고친화도로 특이적으로 결합하고, 약 10 pM 이하의 EC_{50} 으로 세포의 고갈을 매개하고, 상기 특성 중 적어도 2가지, 바람직하게는 모두를 나타내는 mAb를 포함한다. 특정 실시양태에서, 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 각각에서 상기 특성 중 적어도 하나를 가질 수 있고/거나 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 카바트 방법에 의해 정의된 바와 같은 하기 CDR을 포함할 수 있다: 서열식별번호: 33으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR1; 서열식별번호: 34로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR2; 서열식별번호: 35로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR3; 서열식별번호: 36으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR1; 서열식별번호: 37로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR2; 및 서열식별번호: 38로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR3. 또 다른 예에서, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 4로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 16으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 을 포함할 수 있다. 추가적인 예에서, 이러한 Ab는 서열식별번호: 100으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 112로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 임의로, Ab는 그의 중쇄의 감소된 푸코실화를 갖거나, 또는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 저푸코실화 또는 비푸코실화 중쇄 불변 영역을 갖는다.

[0380] 특정 실시양태에서, 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 115로 제시된 서

열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 각각에서 상기 특성 중 적어도 하나를 가질 수 있고/거나 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 Ab 또는 이의 항원-결합 부분은 카바트 방법에 의해 정의된 바와 같은 하기의 CDR을 포함할 수 있다: 서열식별번호: 103으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR1; 서열식별번호: 104로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR2; 서열식별번호: 105로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR3; 서열식별번호: 106으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR1; 서열식별번호: 107로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR2; 및 서열식별번호: 108로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR3. 또 다른 예로서, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 115로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 116으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 을 포함할 수 있다. 추가의 예로서, 이러한 Ab는 서열식별번호: 117로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 118로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 임의로, Ab는 그의 중쇄의 감소된 푸코실화를 갖거나, 또는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 저푸코실화 또는 비푸코실화 중쇄 불변 영역을 갖는다.

[0381] 특정 실시양태에서, 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 각각에서 상기 특성 중 적어도 하나를 가질 수 있고/거나 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 Ab 또는 이의 항원-결합 부분은 카바트 방법에 의해 정의된 바와 같은 하기의 CDR을 포함할 수 있다: 서열식별번호: 45로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR1; 서열식별번호: 46으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR2; 서열식별번호: 47로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H CDR3; 서열식별번호: 48로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR1; 서열식별번호: 49로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR2; 및 서열식별번호: 50으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L CDR3. 또 다른 예에서, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 6으로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_H 및 서열식별번호: 18로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 V_L 을 포함할 수 있다. 추가적인 예에서, 이러한 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 임의로, Ab는 그의 중쇄의 감소된 푸코실화를 갖거나, 또는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 저푸코실화 또는 비푸코실화 중쇄 불변 영역을 갖는다.

[0382] 개시된 치료 방법에서 사용하기에 적합한 항-PD-1/항-PD-L1 Ab

[0383] 본원에 개시된 암 치료 방법, 조성물, 또는 키트에서 사용하기에 적합한 항-PD-1 Ab는 높은 특이성 및 친화도로 PD-1에 결합하고, PD-L1 및/또는 PD-L2의 PD-1에의 결합을 차단하고, PD-1 신호전달 경로의 면역억제 효과를 억제하는, 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb 또는 그의 항원-결합 부분을 포함한다. 유사하게, 이들 방법에서 사용하기에 적합한 항-PD-L1 Ab는 높은 특이성 및 친화도로 PD-L1에 결합하고, PD-L1의 PD-1 및 CD80 (B7-1)에의 결합을 차단하고, PD-1 신호전달 경로의 면역억제 효과를 억제하는, 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb 또는 그의 항원-결합 부분이다. 본원에 개시된 치료 방법 중 임의의 것에서, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 Ab는 각각 PD-1 수용체 또는 PD-L1 리간드에 결합하고, 수용체-리간드 결합을 억제하고, T 세포 활성의 억제를 역전시켜 면역 반응을 상향조절하는 데 있어 전체 Ab의 것과 유사한 기능적 특성을 보이는 항원-결합 부분 또는 단편을 포함한다.

[0384] 항-PD-1 mAb

[0385] 높은 친화도로 PD-1에 특이적으로 결합하는 mAb는 미국 특허 번호 8,008,449에 개시되어 있다. 다른 항-PD-1 mAb는, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,488,802, 8,168,757, 8,354,509, 및 9,205,148에 기재되어 있다. 미국 특허 번호 8,008,449에 개시된 항-PD-1 mAb는 하기 특징 중 여러 개 또는 모두를 나타내는 것으로 입증되었다:

(a) SPR (비아코어®) 바이오센서 시스템에 의해 결정 시, 약 50 nM 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합함; (b) 인간 CD28, CTLA-4 또는 ICOS에 실질적으로 결합하지 않음; (c) 혼합 림프구 반응 (MLR) 검정법에서 T-세포 증식, 인터페론- γ 생산 및 IL-2 분비를 증가시킴; (d) 인간 PD-1 및 시노물구스 원숭이 PD-1에 결합함; (e) PD-L1 및 PD-L2의 PD-1에의 결합을 억제함; (f) $CD4^+CD25^-$ T 세포의 증식 및 인터페론- γ 생산에 대해 Treg 세포에 의해 부여된 억제를 해제시킴; (g) 항원-특이적 기억 반응을 자극함; (h) Ab 반응을 자극함; 및 (i) 생체내에서 종양 세포 성장을 억제함. 개시된 치료 방법, 조성물 또는 키트에서 사용가능한 항-PD-1 Ab는 높은 친화도로 인간 PD-1에 특이적으로 결합하고, 상기 특징 중 적어도 5개, 바람직하게는 모두를 나타내는 mAb를 포함한다. 예를 들어, 본원에 개시된 치료 방법에서 사용하기에 적합한 항-PD-1 Ab는 (a) SPR (비아코어®)에 의해 결정 시, 약 10 nM 내지 0.1 nM의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하고; (b) MLR 검정법에서 T-세포 증식, 인터페론- γ 생산 및 IL-2 분비를 증가시키고; (c) PD-L1 및 PD-L2의 PD-1에의 결합을 억제하고; (d) $CD4^+CD25^-$ T 세포의 증식 및 인터페론- γ 생산에 대해 Treg에 의해 부여된 억제를 역전시키고; (e) 항원-특이적 기억 반응을 자극하고; (f) 생체내에서 종양 세포 성장을 억제한다.

[0386] 다른 항-PD-1 mAb는, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,808,710, 7,488,802, 8,168,757 및 8,354,509, 미국 공개 번호 2016/0272708, 및 PCT 공개 번호 WO 2008/156712, WO 2012/145493, WO 2014/179664, WO 2014/194302, WO 2014/206107, WO 2015/035606, WO 2015/085847, WO 2015/112800, WO 2015/112900, WO 2016/106159, WO 2016/197367, WO 2017/020291, WO 2017/020858, WO 2017/024465, WO 2017/024515, WO 2017/025016, WO 2017/025051, WO 2017/040790, WO 2017/106061, WO 2017/123557, WO 2017/132827, WO 2017/133540 (이들 각각의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0387] 특정 실시양태에서, 항-PD-1 mAb는 니볼루맵 (옵디보®; 이전에 5C4, BMS-936558, MDX-1106, 또는 ONO-4538로 지정됨), 펌브롤리주맵 (키트루다®; 이전에 람브롤리주맵 및 MK-3475로 지정됨; WO 2008/156712A1 참조), PDR001 (WO 2015/112900 참조), MEDI-0680 (이전에 AMP-514로 지정됨; WO 2012/145493 참조), REGN-2810 (WO 2015/112800 참조), JS001 (문헌 [Liu 및 Wu, 2017] 참조), BGB-A317 (WO 2015/035606 및 US 2015/0079109 참조), INCSHR1210 (SHR-1210; WO 2015/085847; 문헌 [Liu 및 Wu, 2017] 참조), TSR-042 (ANB011; WO 2014/179664 참조), GLS-010 (WBP3055; 문헌 [Liu 및 Wu, 2017] 참조), AM-0001 (WO 2017/123557 참조), STI-1110 (WO 2014/194302 참조), AGEN2034 (WO 2017/040790 참조), 및 MGD013 (WO 2017/106061 참조)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0388] 항-PD-1 Ab의 투여를 포함하는, 본원에 기재된 임의의 치료 방법의 특징의 바람직한 실시양태에서, 항-PD-1 Ab는 니볼루맵 (옵디보®)이며, 이는 다수의 다양한 암 치료용으로서 이미 미국 식품 의약품국 (FDA)의 승인을 받은 것이다. 니볼루맵은 PD-1 리간드 (PD-L1 및 PD-L2)와의 상호작용을 선택적으로 방지하여 항종양 T-세포 기능의 하향-조절을 차단하는 완전 인간 IgG4 (S228P) PD-1 면역 체크포인트 억제제 Ab이다 (미국 특허 번호 8,008,449에 mAb C5로서 기재됨; 문헌 [Wang et al., 2014]). 다른 바람직한 실시양태에서, 항-PD-1 Ab는 펌브롤리주맵 (키트루다®; PD-1에 대해 지시되는 인간화 모노클로날 IgG4 Ab이며, 미국 특허 번호 8,354,509에 h409A11로 기재됨)이며, 이는 또한 다수의 암 적응증에 대해 승인을 받은 것이다.

[0389] 개시된 방법에서 사용가능한 항-PD-1 Ab, 조성물 또는 키트는 또한 인간 PD-1 (hPD-1)에 특이적으로 결합하고, 본원에 기재된 항-PD-1 Ab 중 어느 하나와 인간 PD-1에의 결합에 대해 교차-경쟁하는 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb, 예를 들어, 니볼루맵 (5C4; 예를 들어, 미국 특허 번호 8,008,449; WO 2013/173223 참조) 및 펌브롤리주맵을 포함한다. 항원, 본 경우에서, 인간 PD-1에의 결합에 대해 참조 Ab, 예를 들어, 니볼루맵 또는 펌브롤리주맵과 교차-경쟁하는 Ab는 표준 PD-1 결합 검정법 예컨대 비아코어® 분석, ELISA 검정법 또는 유동 세포측정법에서 용이하게 확인될 수 있다 (예를 들어, WO 2013/173223 참조). 특정 실시양태에서, 항-PD-1 Ab는 본원에 기재된 항-PD-1 Ab 중 임의의 것, 예를 들어, 니볼루맵 또는 펌브롤리주맵과 동일한 에피토프에 결합한다.

[0390] 개시된 발명의 방법에서 사용가능한 항-PD-1 Ab는 또한 Fab, F(ab')₂, Fd 또는 Fv 단편, sdAb, scFv, 디-scFv 또는 비-scFv, 디아바디, 미니바디 또는 단리된 CDR을 비롯한 항원-결합 부분을 포함한다 (추가 상세한 설명을 위해, 문헌 [Hollinger 및 Hudson, 2005; Olafsen 및 Wu, 2010] 참조).

[0391] 특정 실시양태에서, 단리된 항-PD-1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 이소형의 것인 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특징의 바람직한 실시양태에서, 항-PD-1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 IgG4 이소형의 것인 중쇄 불변 영역을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항-PD-1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 IgG1 이소형의 것이다. 특징의 다른 실시양태에서, 항-PD-1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분의 IgG4 중쇄

불변 영역은, 힌지 영역 내의 세린 잔기를 IgG1 이소형 Ab의 상응하는 위치에서 일반적으로 발견되는 프롤린 잔기로 대체하는 S228P 돌연변이 (카바트 시스템을 사용하여 넘버링; 문헌 [Kabat et al., 1983])를 함유한다. 니볼루맵에 존재하는 상기 돌연변이는 야생형 IgG4 Ab와 연관된 Fc 수용체 활성화를 위한 낮은 친화도는 유지하면서, 내인성 IgG4 Ab와의 Fab 아암 교환을 방지한다 (Wang et al., 2014). 또 다른 실시양태에서, Ab는 인간 카파 또는 람다 불변 영역인 경쇄 불변 영역을 포함한다.

[0392] 본 방법의 다른 실시양태에서, 항-PD-1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 mAb 또는 그의 항원-결합 부분이다. 인간 대상체에게 투여의 경우에, 항-PD-1 Ab는 바람직하게는, 키메라 Ab 또는 보다 바람직하게는, 인간화 또는 인간 Ab이다. 상기 키메라, 인간화 또는 인간 mAb는 관련기술 분야에 널리 공지된 방법에 의해, 예를 들어, 미국 특허 번호 8,008,449에 기재된 바와 같이 제조 및 단리될 수 있다.

[0393] 항-PD-L1 mAb

[0394] 항-PD-1 및 항-PD-L1은 동일한 신호전달 경로를 표적화하고, 임상 시험에서 다양한 암에서 유사한 수준의 효능을 나타내는 것으로 제시되어 있으므로 (예를 들어, 문헌 [Brahmer et al., 2012]; WO 2013/173223 참조), 항-PD-L1 Ab는 본원에 개시된 조합 요법 방법에서 항-PD-1 Ab를 대신하여 치환될 수 있다.

[0395] 개시된 방법, 조성물 또는 키트에서 사용하기에 적합한 항-PD-L1 Ab는 높은 특이성 및 친화도로 PD-L1에 결합하고, PD-L1의 PD-1에의 및 CD80에의 결합을 차단하고, PD-1 신호전달 경로의 면역억제 효과를 억제하는 단리된 Ab이다. 높은 친화도로 PD-L1에 특이적으로 결합하는 mAb는 미국 특허 번호 7,943,743에 개시되어 있다. 다른 항-PD-L1 mAb는 미국 특허 번호 8,217,149, 8,779,108, 9,175,082 및 9,624,298, 및 PCT 공개 번호 WO 2012/145493에 기재되어 있다. 미국 특허 번호 7,943,743에 개시된 항-PD-1 HuMAb는 하기 특징 중 1개 이상을 나타내는 것으로 입증되었다: (a) SPR (비아코어®)에 의해 결정 시, 약 50 mM 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합함; (b) MLR 검정법에서 T-세포 증식, 인터페론- γ 생산 및 IL-2 분비를 증가시킴; (c) Ab 반응을 자극함; (d) PD-L1의 PD-1에의 결합을 억제함; 및 (e) T 세포 이펙터 세포 및/또는 수지상 세포에 대한 Treg의 억제 효과를 역전시킴. 본원에 개시된 치료 방법에서 사용하기 위한 항-PD-L1 Ab는 높은 친화도로 인간 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 상기 특징 중 적어도 1개, 일부 실시양태에서, 적어도 3개, 바람직하게는, 모두를 나타내는, 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb를 포함한다. 예를 들어, 이들 방법에서 사용하기에 적합한 항-PD-L1 Ab는 (a) 표면 플라즈몬 공명 (비아코어®)에 의해 결정 시, 약 50 mM 내지 0.1 mM의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하고; (b) MLR 검정법에서 T-세포 증식, 인터페론- γ 생산 및 IL-2 분비를 증가시키고; (c) PD-L1의 PD-1에의 및 CD80에의 결합을 억제하고; (d) T 세포 이펙터 세포 및/또는 수지상 세포에 대한 Treg의 억제 효과를 역전시킨다.

[0396] 본 방법에서 사용하기에 적합한 항-PD-L1 Ab는 BMS-936559 (이전에 MDX-1105; 미국 특허 번호 7,943,743에서 12A4로 지정됨)이다. 다른 적합한 항-PD-L1 Ab는 아테졸리주맵 (테센트릭®; 이전에 RG7446 및 MPDL3280A로 공지됨; 미국 특허 번호 8,217,149에서 YW243.55S70으로 지정됨; 또한 문헌 [Herbst et al., 2014] 참조), 두르발루맵 (임핀지®; 이전에 MEDI-4736으로 공지됨; 미국 특허 번호 8,779,108에서 2.14H90PT로 지정됨), 아벨루맵 (바벤시오(BAVENCIO)®; 이전에 MSB-0010718C로 공지됨; 미국 특허 번호 9,624,298에서 A09-246-2로 지정됨), STI-A1014 (미국 특허 번호 9,175,082에서 H6으로 지정됨), CX-072 (WO 2016/149201 참조), KN035 (문헌 [Zhang et al., 2017] 참조), LY3300054 (예를 들어, WO 2017/034916 참조), 및 CK-301 (문헌 [Gorelik et al., 2017] 참조)을 포함한다.

[0397] 항-PD-L1 Ab의 투여를 포함하는 본원에 기재된 임의의 치료 방법의 특징의 바람직한 실시양태에서, 항-PD-L1 Ab는 아테졸리주맵 (테센트릭®)이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 항-PD-L1 Ab는 두르발루맵 (임핀지®)이다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 항-PD-L1 Ab는 아벨루맵 (바벤시오®)이다.

[0398] 개시된 방법, 조성물, 또는 키트에서 사용하기에 적합한 항-PD-L1 Ab는 또한 인간 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 본원에 개시된 항-PD-L1 Ab 중 어느 하나, 예를 들어, BMS-936559 (12A4; 예를 들어, 미국 특허 번호 7,943,743; WO 2013/173223 참조), 아테졸리주맵, 두르발루맵, 아벨루맵 또는 STI-A1014일 수 있는 참조 Ab와 인간 PD-L1에의 결합에 대해 교차-경쟁하는 단리된 Ab를 포함한다. 인간 PD-L1에의 결합에 대해 참조 Ab와 교차-경쟁할 수 있는 Ab의 능력은 상기 Ab가 참조 Ab와 동일한 PD-L1의 에피토프 영역에 결합한다는 것을 입증하고, 실질적으로 동일한 PD-L1의 에피토프 영역에 그가 결합한다는 점에서 참조 Ab의 특성과 매우 유사한 기능적 특성을 가질 것으로 예상된다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 Ab는 본원에 기재된 항-PD-L1 Ab 중 임의의 것, 예를 들어, 아테졸리주맵, 두르발루맵, 아벨루맵 또는 STI-A1014와 동일한 에피토프에 결합한다. 교차-경쟁 Ab는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 표준 PD-L1 결합 검정법 예컨대 비아코어® 분석, ELISA 검

정법 또는 유동 세포측정법에서 참조 Ab 예컨대 아테졸리주맙 또는 아벨루맙과 교차-경쟁할 수 있는 그의 능력에 기초하여 용이하게 확인될 수 있다 (예를 들어, WO 2013/173223 참조).

- [0399] 특정의 바람직한 실시양태에서, 본 방법에서 사용하기 위한 단리된 항-PD-L1 Ab는 mAb이다. 다른 실시양태에서, 특히 인간 대상체에게 투여의 경우에, 이들 Ab는 바람직하게는, 키메라 Ab, 또는 보다 바람직하게는, 인간화 또는 인간 Ab이다. 키메라, 인간화 및 인간 Ab는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 의해, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,943,743에 기재된 바와 같이 제조 및 단리될 수 있다.
- [0400] 특정 실시양태에서, 항-PD-L1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 이소형의 것인 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특정의 다른 실시양태에서, 항-PD-L1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 IgG1 또는 IgG4 이소형의 것이다. 추가 실시양태에서, 항-PD-L1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분의 IgG4 중쇄 불변 영역의 서열은 S228P 돌연변이를 함유한다. 다른 실시양태에서, Ab는 인간 카파 또는 람다 불변 영역인 경쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0401] 본 발명의 항-PD-L1 Ab는 또한 PD-L1에 결합하고, 수용체 결합을 억제하고 면역계를 상향-조절하는 데 있어 전체 Ab의 것과 유사한 기능적 특성을 나타내는, Fab, F(ab')₂, Fd, Fv, 및 scFv, 디-scFv 또는 비-scFv, 및 scFv-Fc 단편, 나노바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 및 단리된 CDR을 비롯한, 상기 Ab의 항원-결합 부분을 포함한다.
- [0402] 제약 조성물 및 투여 요법
- [0403] 본원에 개시되고 임의의 기재된 치료 방법에 사용되는 mAb는 조성물, 예를 들어 Ab 및 제약상 허용되는 담체를 함유하는 제약 조성물로 구성될 수 있다. 본 발명은 또한 임의의 개시된 면역접합체 또는 이중특이적 분자 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 본원에 사용된 "제약상 허용되는 담체"는 생리학상 수용성인 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, Ab를 함유하는 조성물을 위한 담체는 (예를 들어, 주사 또는 주입에 의해) 정맥내 (IV), 근육내, 피하 (SC), 비경구, 척추 또는 표피 투여하는 데 적합하다.
- [0404] SC 주사를 위한 옵션은 세포의 매트릭스에 기인하여 피하로 전달될 수 있는 생물체제 및 약물의 부피에 대한 종래 제한을 제거하는, Ab, 예를 들어 mAb와 재조합 인간 히알루로니다제 효소 (rHuPH20)의 공동-체제화를 수반하는, 할로자임 테라퓨틱스(Halozyne Therapeutics)의 인헨즈(ENHANZE®) 약물 전달 기술에 기초한다 (미국 특허 번호 7,767,429). 조합 요법에서 사용되는 2종의 Ab를 SC 투여를 위한 단일 조성물로 공동-체제화시킬 수 있다.
- [0405] 본 발명의 제약 조성물은 1종 이상의 제약상 허용되는 염, 항산화제, 수성 및 비-수성 담체, 및/또는 아주반트, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 포함할 수 있다.
- [0406] 투여 요법은 최적의 목적하는 반응, 예를 들어 최대의 치료 반응 및/또는 최소의 유해 효과를 제공하도록 조정된다. 조합 사용하는 경우를 포함하여, 항-CCR8, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분의 투여를 위한 투여량은 대상체의 체중 1 kg당 약 0.01 내지 약 20 mg, 바람직하게는, 약 0.1 내지 약 10 mg 범위일 수 있다. 예를 들어, 투여량은 약 0.1, 0.3, 1, 2, 3, 5 또는 10 mg/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 0.3, 1, 3, 또는 10 mg/kg 체중일 수 있다. 대안적으로, 체중을 기준으로 한 용량 대신에, 고정 또는 균일 용량, 예를 들어 약 0.1 내지 약 2,000 mg, 바람직하게는 약 1 내지 약 1,000 mg, 예컨대 약 0.3, 1, 3, 5, 10, 30, 60, 100, 150, 200, 240, 300, 400, 500, 600, 800 또는 1,000 mg의 Ab 또는 그의 항원-결합 부분이 투여될 수 있다. 균일 (vs. 체중-기반) 투여는 제조의 용이성, 의약 오류의 감소된 위험, 및 대부분의 생물체제에 대해 2가지 투여 접근법이 유사하게 수행된다는 관찰로 인해 매력적이다 (Wang et al., 2009).
- [0407] 투여 스케줄은 전형적으로 Ab의 전형적인 약동학적 특성에 기초하여 수용체 점유율 (RO)을 지속시키는 노출을 달성하도록 설계된다. 예시적인 치료 요법은 1주에 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 1개월 1회, 3-6개월 또는 그 초과마다 1회 투여하는 것을 수반한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-CCR8, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 대상체에게 2주마다 1회 투여된다. 다른 바람직한 실시양태에서, Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 3주마다 1회 또는 4주마다 1회 투여된다. 투여량 및 스케줄링은 치료 과정 동안 바뀔 수 있다. 잠재적으로 효과적인 용량 미만의 용량에 대한 참가자의 노출 및 시토카인 방출의 위험을 최소화하면서 적절한 안전성을 보장할 목적으로 약리학- 및 독성학-기반 접근법을 혼합하여 생성한 전체 데이터를 사용하여 4A19에 대한 Q2W 0.3 mg (4 µg/kg) IV의 인간-최초 (FIH) 출발 균일 용량을 유도하였다.

- [0408] 실시예 34에 기재된 임상 시험에서, 약리학- 및 독성학-기반 접근법의 혼합으로부터 생성된 전체 데이터를 사용하여 최초 인간 대상 (FIH) 임상 연구에 사용되는 투여량을 결정하였다. 항-CCR8 단독요법 부분의 용량 증량 상에서, 4A19의 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 또는 800 mg의 균일 용량이 대상체에게 2주마다 1회 (Q2W) 정맥 내로 (IV) 투여된다. 조합 요법 부분에서, 4A19의 동일한 용량이 용량 증량 상에서 4주마다 1회 (Q4W) 480 mg의 FDA-승인된 균일 용량으로 IV 투여된 니볼루맵과 조합하여 투여된다. 용량 확장을 위해, 단일-부분 및 무작위화 코호트를 증량 상과 상이한 종양 유형 및 용량 수준을 포함하도록 개방하고, 단독요법 또는 조합 요법으로서의 치료를 진행, 허용되지 않는 독성, 동의 철회, 연구 요법의 26 사이클의 완료 (104주), 또는 연구 종료 중 어느 것이든 먼저 발생하는 때까지 계속한다.
- [0409] 따라서, 개시된 요법 방법의 특정 실시양태에서, 항-CCR8 Ab는 대상체에게 단독요법으로서, 또는 면역 체크포인트 억제제, 예를 들어 항-PD-1 또는 항-PD-L1 Ab와 조합하여, Q2W 약 0.3 내지 약 800 mg의 균일 용량으로 투여된다. 보다 구체적으로, 특정 실시양태에서, 항-CCR8 Ab는 Q2W 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 또는 800 mg으로 투여된다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-CCR8 Ab는 mAb 4A19이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 항-CCR8 Ab는 mAb 14S5 또는 14S15h이다. 특정 실시양태에서, 항-CCR8 Ab는 Q2W 3 mg의 균일 용량으로 대상체에게 투여된다. 특정의 다른 실시양태에서, 항-CCR8 Ab는 Q2W 10 mg으로 투여된다. 다른 실시양태에서, 항-CCR8 Ab는 Q2W 30 mg의 균일 용량으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 항-CR8 Ab는 Q2W 100 mg의 균일 용량으로 대상체에게 투여된다.
- [0410] 조합 요법의 경우, 특정 실시양태에서, 면역 체크포인트 억제제는 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA-4 Ab이다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-PD-1 Ab는 니볼루맵이다. 바람직한 실시양태에서, 니볼루맵은 대상체에게 Q4W 480 mg의 균일 용량으로 투여된다.
- [0411] 조합하여 사용되는 경우, 하나 또는 둘 다의 Ab의 치료 투여량 미만의 투여량, 예를 들어 항-CCR8, 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분의 투여량이 사용될 수 있다. 본원에 사용된 치료제, 예컨대 치료제 Ab의 "치료량 미만의" 용량 또는 투여량은 전형적이거나 승인된 단독요법 용량보다 더 낮은 용량을 지칭한다. 예를 들어, 초기 FDA-승인받은 2주마다 3 mg/kg보다 더 낮은 투여량의 니볼루맵, 예를 들어 2, 3, 또는 4주마다 1.0 mg/kg 이하가 치료 투여량 미만의 투여량으로 간주된다. 니볼루맵은 후속적으로 2주마다 240 mg 또는 4주마다 480 mg으로 FDA에 의해 승인되었다. 따라서, 예를 들어 4주마다 승인된 480 mg, 예를 들어 2, 3 또는 4주마다 120 mg 이하의 니볼루맵의 투여량이 치료 투여량 미만의 투여량으로서 간주된다. 니볼루맵으로의 0.3 mg/kg 내지 10 mg/kg을 투여받은 15명의 대상체로부터의 RO 데이터는 PD-1 점유가 상기 용량 범위에서 용량에 비의존하는 것으로 보인다는 것을 나타낸다. 모든 용량에 걸쳐, 평균 점유율은 85% (범위, 70% 내지 97%)였고, 여기서 평균 플래토 점유율은 72% (범위, 59% 내지 81%)였다 (Brahmer et al., 2010). 따라서, 0.3 mg/kg 투여는 충분히 노출시킴으로써 유의한 생물학적 활성을 유도할 수 있다.
- [0412] 대조적으로, 본원에 사용된 바와 같이, 치료제, 예컨대 치료적 Ab의 "효능-미만" 용량 또는 투여량은 유의한 생물학적 활성에 요구되는 용량보다 더 낮은 용량을 지칭하고, 따라서 단독요법으로서 또는 조합 요법으로 투여될 때 어떠한 의미있는 치료 효과도 야기하지 않는다.
- [0413] 마우스 종양 모델에서 관찰된 항-CCR8과 항-PD-1/항-PD-L1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분 사이의 상승작용적 상호작용을 통해 이들 치료제 중 하나 또는 둘 다를 치료 투여량 미만의 용량으로 암 환자에게 투여하도록 할 수 있다. 개시된 조합 요법 방법의 특정 실시양태에서, 항-CCR8 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 암 환자에게 치료 용량 미만의 용량으로 투여된다. 다른 실시양태에서, 항-PD-1/항-PD-L1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 치료 용량 미만의 용량으로 환자에게 투여된다. 추가 실시양태에서, 항-PD-1/항-PD-L1 및 항-CCR8 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 각각 치료 용량 미만의 용량으로 환자에게 투여된다.
- [0414] Ab 중 하나 또는 그들 둘 다를 상기와 같이 치료 용량 미만의 용량으로 투여함으로써 단독요법에서 개별 Ab를 더 높은 용량으로 사용할 때와 비교하여 유해 사건을 감소시킬 수 있다. 따라서, 개시된 조합 요법 방법의 성공은 이들 Ab를 사용하는 단독요법 대비 Ab의 조합의 개선된 효능에서만뿐만 아니라, 단독요법 용량과 비교하여 조합 시 더 낮은 투여량의 약물 사용으로부터 이루어지는 안전성 증가, 즉, 유해 사건 발생 감소에서도 측정될 수 있다.
- [0415] 본원에 개시된 임의의 방법의 특정 실시양태에서, 항-CCR8, 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 Ab는 정맥내 (IV) 투여용으로 또는 피하 (SC) 주사용으로 제제화된다. 특정 실시양태에서, 항-CCR8 Ab 또는 그의 항원-결합 부분 및 항-PD-1/항-PD-L1 Ab 또는 그의 항원-결합 부분은 대상체에게 순차적으로 투여된다. "순차적" 투여는 항-CCR8 및 항-PD-1/항-PD-L1 Ab 중 하나를 나머지 다른 하나 이전에 투여하는 것을 의미한다. Ab 중 어느 하나를 먼저 투

여하고; 즉, 특정 실시양태에서, 항-CCR8 Ab 이전에 항-PD-1/항-PD-L1 Ab를 투여하는 반면, 다른 실시양태에서는, 항-CCR8 Ab를 항-PD-1/항-PD-L1 Ab 이전에 투여한다. 특정 실시양태에서, 각 Ab는 IV 주입에 의해, 예를 들어, 약 60분의 기간 동안에 걸쳐 주입에 의해 투여된다. 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 Ab는 SC 주사에 의해 투여된다.

[0416] 순차적 IV 투여의 특정 실시양태에서, 환자의 편의를 위해, 항-CCR8 및 항-PD-1/항-PD-L1 Ab 또는 그의 부분은 서로 30분 이내에 투여된다. 전형적으로, 항-CCR8 및 항-PD-1/항-PD-L1 Ab 둘 다가 같은 날에 IV 투여에 의해 전달되는 경우, 각 주입을 위해 별개의 주입 백 및 필터가 사용된다. 제1 Ab의 주입 후, 제2 Ab의 주입 시작 전에 Ab의 라인을 깨끗이하기 위해 염수 플러시가 즉시 진행된다. 다른 실시양태에서, 두 Ab는 서로 1, 2, 4, 8, 24 또는 48시간 이내에 투여된다.

[0417] SC 투여에 의한 적어도 하나의 Ab 전달은 투여에 필요한 건강 관리 진료의 시간을 감소시키고, 약물 투여 시간을 단축시킨다. 예를 들어, SC 주사의 사용은 IV 투여에 필요한 시간을 전형적으로 약 30-60분에서 약 5분으로 단축시킬 수 있다. 순차적 SC 투여의 특정 실시양태에서, 항-CCR8 및 항-PD-1/항-PD-L1 Ab 또는 그의 부분은 서로 10분 이내에 투여된다.

[0418] 체크포인트 억제제 Ab는 부분적으로는 면역계의 기억 구성요소에 기인하여 매우 오래 지속되는 반응을 생성하는 것으로 제시되었으므로 (예를 들어, WO 2013/173223; 문헌 [Lipson et al., 2013; Wolchok et al., 2013] 참조), 투여된 항-PD-1/항-PD-L1 Ab의 활성은 수주, 수개월, 또는 심지어는 수년 동안 계속해서 진행될 수 있다. 특정 실시양태에서, 순차적 투여를 수반하는 본 조합 요법 방법은 앞서 항-PD-1/항-PD-L1 Ab로 치료받은 환자에게 항-CCR8 Ab를 투여하는 것을 포함한다. 추가 실시양태에서, 항-CCR8 Ab는 항-PD-1/항-PD-L1 Ab로 이전에 치료받았고, 계속 진행 중인 환자에게 투여된다. 다른 실시양태에서, 순차적 투여를 수반하는 본 조합 요법 방법은 앞서 항-CCR8 Ab로 치료받은 환자, 임의로 항-CCR8 Ab를 사용한 치료 후에도 암이 진행되고 있는 환자에게 항-PD-1/항-PD-L1 Ab를 투여하는 것을 포함한다.

[0419] 특정의 다른 실시양태에서, 항-PD-1/항-PD-L1 및 항-CCR8 mAb는 공동-투여를 위해 제약상 허용되는 제제로 단일 조성물로서 혼합되어 공동으로 투여되거나, 또는 각 Ab가 제약상 허용되는 조성물로 제제화된 별개의 조성물로서 공동으로 투여된다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-PD-1/항-PD-L1 및 항-CCR8 mAb는 별개의 조성물로서 공동으로 투여되고, 각각의 Ab는 제약상 허용되는 조성물로 제제화된다. 다른 실시양태에서, 항-PD-1/항-PD-L1 및 항-CCR8 mAb는 제약상 허용되는 제제 중의 단일 조성물로서 공동으로 투여된다.

[0420] 본 개시내용은 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법에서 사용하기 위한, 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하는 저푸코실화 또는 비푸코실화된 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb를 제공하며, 여기서 단리된 Ab는 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하고, 여기서 암은 NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, 위/GE 접합부 암, 및 자궁경부암으로부터 선택된다.

[0421] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 암을 앓고 있는 대상체를 또 다른 치료제와 조합하여 치료하는 방법에서 사용하기 위한, 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하는 저푸코실화 또는 비푸코실화된 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb를 제공하며, 여기서 단리된 Ab는 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하고, 여기서 암은 NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, 위/GE 접합부 암, 및 자궁경부암으로부터 선택되고, 다른 치료제는 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA-4 Ab이다.

[0422] 특정의 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 추가로, 암을 앓고 있는 대상체를 또 다른 치료제와 조합하여 치료하는 방법에 사용하기 위한, 세포의 표면 상에 발현된 hCCR8에 특이적으로 결합하는 저푸코실화 또는 비푸코실화된 단리된 Ab, 바람직하게는 mAb를 제공하며, 여기서 단리된 Ab는 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하고, 여기서 암은 NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, 위/GE 접합부 암 및 자궁경부암으로부터 선택되고, 다른 치료제는 니볼루맵이고, 항-CCR8 Ab는 2주마다 1회 1-30 mg의 용량으로 대상체에게 투여되고, 니볼루맵은 2주마다 1회 240 mg 또는 4주마다 1회 480 mg의 용량으로 대상체에게 투여된다.

[0423] 본 개시내용은 또한 암을 앓고 있는 대상체에게 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하는 저푸코실화 또는 비푸코실화 항-CCR8 mAb의 치료 유효량을 투여하여 상기 대상체를 치료하는

것을 포함하며, 여기서 암은 NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, 위/GE 접합부 암 및 자궁경부암으로부터 선택되는 것인, 상기 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0424] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 암을 앓고 있는 대상체에게 치료 유효량의 (a) 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하는 저푸코실화 또는 비푸코실화 항-CCR8 mAb; 및 (b) 또 다른 치료제를 투여하여 상기 대상체를 치료하는 것을 포함하며, 여기서 암은 NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, 위/GE 접합부 암 및 자궁경부암으로부터 선택되고, 다른 치료제는 항-PD-1, 항-PD-L1 또는 항-CTLA-4 Ab인, 상기 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0425] 특정의 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 추가로 암을 앓고 있는 대상체에게 치료 유효량의 (a) 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하는 저푸코실화 또는 비푸코실화 항-CCR8 mAb; 및 (b) 또 다른 치료제를 투여하여 상기 대상체를 치료하는 것을 포함하며, 여기서 암은 NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, 위/GE 접합부 암 및 자궁경부암으로부터 선택되고, 다른 치료제는 니볼루맙이고, 항-CCR8 Ab는 2주마다 1회 1-30 mg의 용량으로 대상체에게 투여되고, 니볼루맙은 2주마다 1회 240 mg 또는 4주마다 1회 480 mg의 용량으로 대상체에게 투여되는 것인, 상기 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0426] 본 개시내용은 추가로 대상체에게 치료 유효량의 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하는 저푸코실화 또는 비푸코실화 항-CCR8 mAb를 투여하여 대상체에서 종양 세포의 성장이 억제되도록 하는 것을 포함하며, 여기서 암은 NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, 위/GE 접합부 암 및 자궁경부암으로부터 선택되는 것인, 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다.

[0427] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 대상체에게 치료 유효량의 (a) 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하는 저푸코실화 또는 비푸코실화 항-CCR8 mAb; 및 (b) 또 다른 치료제를 투여하여 대상체에서 종양 세포의 성장이 억제되도록 하는 것을 포함하며, 여기서 암은 NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, 위/GE 접합부 암 및 자궁경부암으로부터 선택되고, 다른 치료제는 항-PD-1, 항-PD-L1 또는 항-CTLA-4 Ab인, 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다.

[0428] 특정의 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 추가로 대상체에게 치료 유효량의 (a) 서열식별번호: 102로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 114로 제시된 서열을 갖는 연속적으로 연결된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하는 저푸코실화 또는 비푸코실화 항-CCR8 mAb; 및 (b) 또 다른 치료제를 투여하여 대상체에서 종양 세포의 성장이 억제되도록 하는 것을 포함하며, 여기서 암은 NSCLC, SCCHN, MSS-CRC, 위/GE 접합부 암 및 자궁경부암으로부터 선택되고, 다른 치료제는 니볼루맙이고, 항-CCR8 Ab는 2주마다 1회 1-30 mg의 용량으로 대상체에게 투여되고, 니볼루맙은 2주마다 1회 240 mg 또는 4주마다 1회 480 mg의 용량으로 대상체에게 투여되는 것인, 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다.

[0429] 키트

[0430] 항-CCR8 Ab를 포함하는 키트 또한 본 발명의 범주 내에 있다. 키트는 전형적으로 키트의 내용물의 의도된 용도를 나타내는 라벨 및 사용 지침서를 포함한다. 용어 라벨은 키트 상에 또는 키트와 함께 공급되거나 또는 달리 키트에 동반되는 임의의 서면 또는 기록물을 포함한다. 따라서, 본 개시내용은 (a) CCR8에 특이적으로 결합하고 ADCC에 의한 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 약 0.01 내지 약 20 mg/kg 체중, 예를 들어 약 0.1 또는 1 mg/kg, 또는 약 0.1 내지 약 2,000 mg 고정 용량, 예를 들어 약 3, 10, 30 또는 100 mg 범위의 하나 이상의 투여량의 Ab, 예를 들어 mAb 또는 그의 항원-결합 부분; (b) PD-1, PD-L1 또는 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 임의로 약 0.1 내지 약 20 mg/kg 체중, 예를 들어 약 2 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 200 내지 약 1600 mg 고정 용량, 예를 들어 약 240 또는 480 mg 범위의 하나 이상의 투여량의 Ab, 예를 들어 mAb 또는 그의 항원-결합 부분; 및 (c) 본원에 개시된 임의의 치료 방법에서 CCR8에 특이적으로 결합하는 Ab 또는 그의 부분, 및 임의로 PD-1, PD-L1 또는 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 Ab 또는 그의 부분을 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체를 치료하기 위한 키트를 제공한다.

[0431] 본 개시내용은 추가로 (a) CCR8에 특이적으로 결합하고 ADCC에 의한 CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 약 0.01 내지 약 20 mg/kg 체중, 예를 들어 약 0.1 또는 1 mg/kg, 또는 약 0.1 내지 약 2,000 mg 고정 용량, 예를 들어

약 3, 10, 30 또는 100 mg 범위의 하나 이상의 투여량의 Ab, 예를 들어 mAb 또는 그의 항원-결합 부분; (b) 약 0.1 내지 약 20 mg/kg 체중, 예를 들어 약 2 또는 3 mg/kg, 또는 200 내지 약 1600 mg 고정 용량, 예를 들어 약 240 또는 480 mg의 하나 이상의 투여량의 항-PD-1/항-PD-L1 mAb 또는 그의 항원-결합 부분; 및 (c) 본원에 개시된 임의의 조합 요법 방법에서 항-CCR8 mAb 및 항-PD-1/항-PD-L1 mAb를 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체를 치료하기 위한 키트를 제공한다.

[0432] 특정 실시양태에서, 키트는 체중을 기준으로 한 용량 대신에, 약 0.1 내지 약 2,000 mg, 바람직하게는 약 0.3 내지 약 1,000 mg, 예컨대 약 0.3, 1, 3, 5, 10, 30, 60, 100, 150, 200, 240, 300, 400, 500, 600, 800 또는 1,000 mg 범위의 항-CCR8 Ab 또는 그의 항원-결합 부분을 하나 이상의 고정 투여량으로 포함한다. 특정 실시양태에서, 키트는 2주마다 1회 투여하기 위한 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 및 800 mg의 항-CCR8 Ab를 포함한다. 특정의 다른 실시양태에서, 키트는 약 100 내지 약 600 mg의 항-PD-1/PD-L1 Ab, 예를 들어 2주마다 1회 투여하기 위한 240 mg의 니볼루맵 또는 4주마다 1회 투여하기 위한 480 mg의 니볼루맵을 포함한다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-CCR8 Ab는 mAb 4A19이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 항-CCR8 Ab는 mAb 14S15 또는 14S15h이다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 항-PD-1 Ab는 니볼루맵이다. 다른 실시양태에서, 항-PD-1 Ab는 캄브롤리주맵이다.

[0433] 특정 실시양태에서, Ab는 단위 투여 형태로 공동-패키징될 수 있다. 인간 환자를 치료하기 위한 특정의 바람직한 실시양태에서, 키트는 본원에 개시된 항-인간 PD-1 Ab, 예를 들어 니볼루맵 또는 캄브롤리주맵을 포함한다.

[0434] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 추가로 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌의 내용은 명백하게 본원에 참조로 포함된다.

[0435] 실시예 1

[0436] 종양 Treg에서 CCR8 발현과 FOXP3 발현의 상관관계

[0437] CCR8은 Treg-선택적 마커이다.

[0438] 비-조혈 기원의 종양으로부터의 TCGA 샘플 (Goldman et al., 2019; Wang and Liu, 2019; UCSC 제나 판캔 리포지토리(Xena PanCan Repository)로부터의 배치-보정된 FPKM 값)을 종양 카테고리 (TCGA 지정, 종양 단독)로 나누고, 각각의 전사체에 대한 RNA-seq 데이터를 종양 유형 내의 표준 분포 (평균 = 0, 표준 편차 = 1)로 변환시킨 후, 모든 종양 RNA 데이터를 합하였다. 상호-순위 거리 측정 (Siemers et al., 2017; Huttenhower et al., 2007)을 로그-변환된 전사체의 피어슨 상관 매트릭스로부터 수행하였다.

[0439] 도 1A에 제시된, 모든 비-혈 trega 종양 RNA-seq에 걸친 유전자-유전자 상관관계의 상호 순위-기반 네트워크는 CCR8에 대한 전사체 존재비로서 Treg-선택적 마커로서의 CCR8을 확인하였고, TCGA로부터의 대부분의 암 유형에서 다른 유전자 이웃과 비교하였을 때 FOXP3에 대한 강하면서 선택적인 상관관계를 나타냈다. 공동자극/공동억제 분자 (CTLA4, ICOS, TIGIT)가 FOXP3 및 정규 T 세포 마커 (예를 들어, CD3E, IL2RB, SLAMF1)에 대한 네트워크 중간자의 일부를 점유한다는 것이 주목할 만하다. 선 두께 및 거리는 상호-순위 연관성의 강도를 나타낸다.

[0440] CCR8은 간세포성 암종에서 FOXP3^{high} 림프구 상에서 선택적으로 발현된다

[0441] 데이터를 문헌 [Zheng et al. (2017), NCBI Gene Expression Omnibus: GSE98638]으로부터의 log2 (카운트 + 1), 및 포크플로우(Fauxflow) R/샤이니(Shiny) 툴킷 (<https://github.com/NathanSiemers/FauxFlow>)로 생성된 플롯으로서 로그 척도로 플롯팅하였다. 가시화를 돕기 위해 소량의 가우스 노이즈를 각각의 지점에 첨가하였다.

[0442] 도 1B에 나타난 바와 같이, CCR8은 간세포성 암종 종양 샘플에서 FOXP3^{high} 림프구 상에서 선택적으로 발현되고, FOXP3^{mid} CD8 및 CD4 집단에서는 CCR8 발현이 부재한다.

[0443] CCR8 발현과 다른 유전자의 발현의 연관성

[0444] 스피어만 상관관계 분석을 CCR8 발현 ≥ 1 대 CCR8 발현 < 1 사이의 FOXP3⁺ (발현 ≥ 1) T 림프구 (발현 > 1)에서 수행하였고, 비조정된 스피어만 P 값을 연관된 마커의 평균 유전자 발현의 비에 대해 플롯팅하였다.

[0445] 도 1C는 문헌 [Zheng et al. (2017)]에서 전사체가 FOXP3⁺ 세포 내에서 CCR8 양성 및 음성과 연관됨을 보여준다. CCR8 발현은 보다 높은 수준의 FOXP3 발현 및 Treg의 정규 마커 (IL2RA, IKZF2, BATF)와 연관되는

반면, CCR8의 보다 낮은 발현은 세포독성 T 세포 마커 (GZMA, CD8A)와 연관된다.

- [0446] 실시예 2
- [0447] 조직 가공처리
- [0448] 인간 종양 해리
- [0449] 종양 샘플을 해부 실험실 가위로 세절하고, 제조업체의 지침에 따라 젠틀MACS(gentleMACS) 해리기 (밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec))와 함께 인간 종양 해리 키트 (밀테니 바이오텍, 독일 베르그슈 글라트바흐)를 사용하여 다운스 균질화기로 추가로 기계적으로 해리시키거나 또는 효소적으로 소화시켰다. 세포 현탁액을 70 μ m 세포 스트레이너를 통해 여과하였다.
- [0450] 인간 Treg 분리 및 자극
- [0451] PBMC를 피콜(Ficoll) 밀도 구배 (지이 헬스케어)를 사용하여 튜코팩 (올셀즈)으로부터 분리하였다. CD25⁺ 세포를 항-CD25 마이크로비드(MicroBead) II (밀테니 바이오텍)를 사용하여 자기적으로 풍부화하였다. 풍부화된 세포를 CD25 (4E3, 밀테니 바이오텍), CD127 (A019D5, 바이오레전드), CD45RA (HI100, 바이오레전드), 및 CD4 (SK3, 비디 바이오사이언시스)에 대해 염색하였다. CD4⁺ CD127_{low} CD25_{high} CD45RA⁺ Treg를 BD FACSAria II 상에서 분류하였다. 분리된 나이트 Treg를 10% 태아 소 혈청 (FBS; (지이 헬스케어, 일리노이주 시카고)을 함유하는 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트(Roswell Park Memorial Institute; RPMI) 세포 배양 배지 (코닝(Corning), 뉴욕주 코닝)에서 디나비드(Dynabead) 인간 T-활성화제 CD3/CD28 (써모 피셔 사이언티픽) (3개 비드 대 1개 Treg)을 사용하여 확장시켰다. 3일 후, IL-2 (페프로테크(PeproTech))를 300 U/ml로 첨가하였다. Treg를 확장시키고, 동결보존하였다. 해동된 Treg를 10% FBS 및 100 U/ml의 IL-2를 함유하는 RPMI 배지에서 CD3/CD28 디나비드 (1개 비드 대 1개 Treg)를 사용하여 재자극하였다.
- [0452] 인간 피부 가공처리
- [0453] 43세의 정상 여성 복부 인간 피부로부터의 피부 생검을 효소 P 없이 전체 피부 해리 키트 (밀테니 바이오텍)를 사용하여 MACS C 튜브 (밀테니 바이오텍)에서 밤새 소화시켰다. 세포 현탁액을 세척하고, 여과하고, 염색하였다.
- [0454] 마우스 조직 가공처리
- [0455] 종양을 세절한 다음, 250 U/ml 콜라게나제 IV (워싱턴 바이오케미칼(Worthington Biochemical), 뉴저지주 레이크우드) 및 DNase I (밀리포어시그마(MilliporeSigma), 매사추세츠주 벨링턴)을 사용하여 37°C에서 30분 동안 효소적으로 소화시켰다. 면도된 피부를 세절하고, 이어서 60분 동안 37°C에서 500 μ g/ml 콜라게나제 XI (밀리포어시그마), 500 μ g/ml 히알루로니다제 (밀리포어시그마), 및 100 μ g/ml DNase I로 효소적으로 소화시켰다. 젠틀MACS 해리기 (밀테니 바이오텍)를 사용하여 비장 및 흉선을 기계적으로 해리시켰다. 해리된 비장 및 혈액 샘플 중 적혈구 (RBC)를 암모늄-클로라이드-칼륨 용액 (써모 피셔 사이언티픽)으로 5분 동안 용해시켰다.
- [0456] 연구 승인
- [0457] 인간 종양, 피부, 비장, 환자 혈액 및 건강한 혈액 튜코팩 샘플을 상업적 공급자 (바이오IVT(BioIVT), 뉴욕주 웨스트베리; MT 그룹, 아바덴(Avaden), 바이오옵션즈(BioOptions), 디스커버리 라이프 사이언시스(Discovery Life Sciences), 캘리포니아주 로스 오소스; 올셀즈(AllCells), 캘리포니아주 앨러미다) 또는 협동 인간 조직 네트워크 (CHTN)를 통해 수집하였다. 모든 샘플을 미국 내 IRB-승인된 연구 위치에서 서면 사전 동의서를 제공한 공여자로부터 수집하였다.
- [0458] 건강한 공여자로부터의 혈액을 모든 관련 윤리 규정에 따라 브리스톨 마이어스 스쿼프(Bristol Myers Squibb) (BMS) 직업 건강 부서에 의해 투여된 혈액 공여 프로그램으로부터 수득하였다. 모든 동물 실험은 기관 지침에 따랐고, 프로토콜 1612-01 하에 BMS에서 IACUC의 승인을 받았다.
- [0459] 실시예 3
- [0460] CCR8은 인간 종양에서 낮은 염증유발 잠재력과 함께 억제 FOXP3⁺ 세포를 표시한다
- [0461] 여러 Treg-연관 분자의 발현 프로파일을 유동 세포측정법에 의해 비교하였다.

[0462] 유동 세포측정법

[0463] 유동 세포측정법을 위해, 일반적으로, 세포 현탁액을 아민 반응성 생존율 염료로 염색하였다. 이어서, 인간 세포를 래트, 마우스, 및 인간 A/B 혈청 (겜셀(GEMCELL)TM; 제미니 바이오(Gemini Bio), 캘리포니아주 웨스트 새크라멘토), 인간 트루스테인(TRUSTAIN) FcXTM (바이오레전드(BioLegend)), 및 트루-스테인(TRUE-STAIN) 단핵구 차단제TM (바이오레전드)로 차단하였다. 마우스 세포를 FcR 차단 시약 (밀테니 바이오텍)으로 차단하였다. 세포를 표면 염색하고, 제조업체의 프로토콜을 사용하여 FOXP3 전사 인자 염색 완충제 세트 (쓰모 피셔 사이언티픽)를 사용하여 세포내 염색을 수행하였다. 비접합 mAb의 결합을 위해, 적절한 2차 Ab (잭슨 면역노리서치 래보러토리즈(Jackson ImmunoResearch Laboratories))를 사용하였다. 샘플을 BD LSR포르테사(LSRFortessa) X-20을 사용하여 획득하고, 플로우조(FlowJo) (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 분석하였다. 유동 세포측정법 Ab의 완전한 목록은 표 2에 제공된다.

[0464] 표 2: 유동 세포측정 분석에 사용된 Ab

표지	종	클론	형광단	제조업체
CD45	인간	HI10	AF488	바이오레전드
CCR4	인간	L291H4	PE	바이오레전드
CCR4	인간	L291H4	BV510	바이오레전드
CD16	인간	3G8	AF647	바이오레전드
CD8a	인간	SK1	PerCP-이플루오르 710	쓰모 피셔
CD56	인간	CMSSB	PE-이플루오르 610	쓰모 피셔
FOXP3	인간	236A/E7	PE-Cy7	쓰모 피셔
CCR8	인간	433H	BV421	비디 바이오사이언시스
CD15	인간	W6D3	BV510	비디 바이오사이언시스
CD4	인간	SK3	BV650	비디 바이오사이언시스
CD4	인간	SK3	BV605	비디 바이오사이언시스
CTLA4	인간	BNI3	BV421	비디 바이오사이언시스
HLA-DR	인간	G46-6	BUV395	비디 바이오사이언시스
PD-1	인간	EH12.1	BUV737	비디 바이오사이언시스
CD3	인간	UCHT1	BUV805	비디 바이오사이언시스
CD3	인간	UCHT1	APC	비디 바이오사이언시스
CD39	인간	A1	BV786	바이오레전드
그랜자임 B	인간	QA16A02	PE	바이오레전드
IFNg	인간	4S.B3	PE-이플루오르 610	쓰모 피셔
IL-1R2	인간	MA5-23626	APC	쓰모 피셔
IL-2	인간	MQ1-17H12	BUV737	비디 바이오사이언시스
CD19	인간	SJ25C1	BV510	비디 바이오사이언시스

[0465]

표적	종	클론	형광단	제조업체
CD25	인간	2A3	APC-R700	비디 바이오사이언시스
CD3e	마우스	145-2C11	BV421	바이오레전드
CCR8	마우스	SA214G2	AF647	바이오레전드
CCR8	마우스	SA214G2	PE	바이오레전드
IFNg	마우스	XMG1.2	PE-Cy7	바이오레전드
TNFa	마우스	MP6-XT22	APC	바이오레전드
FOXP3	마우스	FJK-16a	PE-이폴루오르 610	써모 피셔
CD8a	마우스	53-6.7	BUV805	비디 바이오사이언시스
CD8b	마우스	H35-17.2	BV650	비디 바이오사이언시스
CD4	마우스	RM4-4	BV786	비디 바이오사이언시스
CD4	마우스	RM4-5	BV786	비디 바이오사이언시스
CD45	마우스	30-F11	BUV395	비디 바이오사이언시스
CD90.1	마우스	OX-7	BB700	비디 바이오사이언시스
CD90.2	마우스	30-H12	BV421	바이오레전드
CD45.2	마우스	104	APC	바이오레전드
CD45.1	마우스	A20	BUV395	비디 바이오사이언시스
고정가능 생존율 염색 575V	NA	NA	NA	비디 바이오사이언시스

[0466]

[0467]

CCR8은 종양-연관 Treg에 대한 마커이다

[0468]

CCR8은 고형 종양 외과적 절제로부터 단리된 FOXP3⁺ Treg 상에서 고도로 발현되었지만, 발현은 환자-매칭된 혈액으로부터의 Treg 상에서 유의하게 보다 낮았다. 대조적으로, CCR4, CTLA-4, 및 CD25는 종양 및 혈액으로부터의 Treg에 의해 유사한 빈도로 발현되었다 (도 2A). FOXP3⁺ Treg 상의 CCR8의 세포당 존재비는 말초 혈액 Treg와 비교하여 종양 Treg에서 더 높은 반면 (도 2B), CCR4 발현은 말초 혈액 Treg와 비교하여 종양 Treg에서 더 낮았다. CD4⁺FOXP3⁻ 통상적인 T 세포 (CD4⁺ Tconv) 상에서, CCR8은 종양 및 말초 혈액 둘 다에서 CCR4 및 CD25보다 덜 빈번하게 발현되었다 (도 2C 및 D). 혈액 및 종양-침윤 CD8⁺ T 세포는 혈액 내의 CD25를 제외하고 모든 4종의 분자의 미미한 발현을 보였다 (도 2E 및 2F). 이들 데이터는 CCR8이 항종양 Teff 세포 집단을 손상시킬 위험이 비교적 낮은 종양 Treg를 표적화하기 위한 고도로 선택적인 마커임을 시사한다.

[0469]

실시예 4

[0470]

T 림프구의 상이한 하위세트 상의 CCR8의 발현

[0471]

인간 종양과 연관된 T 림프구의 상이한 하위세트의 CCR8의 발현 수준을 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 절제된 인간 종양 (팽대부암, 결장직장암 (CRC), 십이지장암, 두경부암, 흑색종, NSCLC, 난소암, 이하선암, 신 세포 암종 (RCC), 위암, 갑상선암, 설암)을 기계적으로 또는 효소적으로 해리시켰다. 말초 혈액 내의 Treg 및 종양-침윤 Treg에서의 CCR8 발현 수준을 비교하기 위해, CRC, RCC, 흑색종, 및 NSCLC 환자로부터의 절제된 종양을 사용하였다. 해리 또는 소화 후에, 세포를 여과하고, 생존율에 대해 염색한 후, CCR8에 결합하는 피코에리트린 (PE)-접합된 Ab (항-hCCR8 Ab 클론 L263G8; 바이오레전드), CD3, CD4 및 CD8)를 포함하는 표면 마커를 표지하였다. 표면 염색 완료시, 세포를 세척한 다음, 고정시키고, FOXP3에 대한 세포내 염색을 위해 투과화하였

다. 세척 후에, 세포 샘플을 유동 세포측정기 상에서 처리하고, 데이터를 플로우조 소프트웨어 (플로우조, 오레곤주 애슬랜드)를 사용하여 분석하여 평균 형광 강도 (MFI)를 계산하였다. Treg는 $CD3^{+}CD4^{+}FOXP3^{+}$ T 세포로서 정의되는 한편, CD4 Tconv 세포, 또는 통상적인 $CD4^{+}$ T 세포는 $CD3^{+}CD4^{+}FOXP3^{-}$ T 세포이다.

[0472] 도 3A에 나타난 바와 같이, CCR8은 공지된 Treg-연관 전사 인자인 FOXP3에 의해 정의된 바와 같이 높은 비율의 종양-상주 Treg (종양 82%)에 의해 발현된다. 대조적으로, 유의하게 더 작은 분획의 통상적인 종양-침윤 $CD4^{+}$ T 세포 및 $CD8^{+}$ T 세포가 CCR8을 발현한다 (각각 종양 12.65% 및 4.55%). 작은 비율의 CD4 Tconv 세포가 CCR8을 발현하지만, 세포당 기준으로 CCR8의 발현 수준은 CD4 Tconv 세포보다 Treg 상에서 유의하게 더 높으며 (종양 MFI 2106 대 132, $P < 0.0001$), $CD8^{+}$ T 세포는 무시할만한 수준의 CCR8을 발현한다 (도 3B). 말초 혈액 내의 Treg는 또한 CCR8을 발현하지만, 종양-침윤 Treg 상에서 관찰된 것보다 훨씬 더 낮은 수준으로 발현한다 (도 3C). 특히적으로 Treg 상에서의 CCR8의 높은 발현 수준은 CCR8을 항-CCR8 Ab를 사용하여 ADCC를 통해 면역억제 세포 집단을 고갈시키는 데 적합한 표적으로 만든다.

[0473] 실시예 5

[0474] 말초 Treg의 하위집단 상에서의 CCR8의 발현

[0475] 말초 Treg의 상이한 하위집단에 의한 CCR8의 발현 수준을 조사하기 위해, PBMC를 5명의 건강한 공여자로부터의 밀도 구배를 사용하여 분리하고, CCR8, CD3, CD4, CD8a, FOXP3 (세포내), CCR8 및 CD45RO에 대해 염색하였다. T 세포를 $CD4^{+}FOXP3^{+}$ T 세포 (Treg), $CD4^{+}FOXP3^{-}$ T 세포 (CD4 Tconv), 및 CD8 T 세포 ($CD3^{+}CD8a^{+}$) 하위세트로 세분화하였다. 이들 하위세트를 CCR8 발현의 검사를 위해 나이브 ($CD45RO^{-}CCR7^{+}$), 이펙터 기억 (EM; $CD45RO^{+}CCR7^{-}$), 및 중심 기억 (CM, $CD45RO^{+}CCR7^{+}$) 집단으로 추가로 나누었다. 세포를 유동 세포측정기를 통해 처리하고, 플로우조 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. PBMC를 또한 암 환자의 하위집단으로부터 분리하고, 인간 종양-침윤 림프구에 대해 실시예 4에 기재된 바와 같이 CCR8 발현에 대해 염색하였다.

[0476] 결과를 도 4에 나타냈다. 도 4A는 CCR8이 높은 백분율의 종양-침윤 Treg에서의 발현 (종양 82%; 도 3A 참조)과 비교하여 건강한 대상체로부터의 말초 혈액 Treg의 작은 분획 (종양 21%)에서 발현된다는 것을 보여준다. 건강한 대상체로부터의 Treg 집단 내에서, CCR8은 이펙터 기억 집단 (EM)에서 더 고도로 발현되고, 중심 기억 세포 (CM)에서는 더 적은 정도로 발현되는 한편 (도 4B), 나이브 Treg (도 4B) 또는 $CD4^{+}$ 통상적인 T 세포 (도 4C) 상에서는 CCR8 발현이 거의 관찰되지 않는다. $CCR8^{+}$ Treg 집단 내에서, 종양-연관 $CCR8^{+}$ Treg는 결합된 항-CCR8 Ab의 MFI에 의해 측정된 바와 같이 세포당 기준으로 말초 $CCR8^{+}$ Treg보다 더 많은 CCR8을 발현한다 (도 4D).

[0477] 실시예 6

[0478] 가장 억제성인 $FOXP3^{high}$ Treg 상에서의 CCR8의 발현

[0479] $FOXP3^{-}$ Treg 및 Treg 발현 배지 상에서의 CCR8의 발현 및 FOXP3 발현의 높은 수준을 유동 세포측정법에 의해 조사하였다. 2명의 흑색종 및 1명의 RCC 환자로 부터 절제된 인간 종양을 절개 가위 및 다운스를 사용하여 기계적으로 해리시켰다. 해리 후에, 세포를 여과하고, 생존율에 대해 염색한 후, 실시예 4에 기재된 바와 같이 표면 마커를 CCR8, CD3, CD4, 및 CD8에 결합하는 Ab로 표지하였다. 표면 염색 완료시, 세포를 세척한 다음, 고정시키고, FOXP3에 대한 세포내 염색을 위해 투과화하였다. 세척 후에, 샘플을 유동 세포측정기 상에서 처리하고, 데이터를 플로우조 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 분석을 위해 $CD3^{+}CD4^{+}$ 집단에 대해 세포를 게이팅하였다.

[0480] 도 5에 나타난 바와 같이, CCR8은 주로 가장 활성화된 Treg를 나타내는 $CD4^{+}FOXP3^{high}$ 집단에 의해 발현된다. 2개의 흑색종 환자 종양 샘플에서와 같이 명백한 $FOXP3^{mid}$ 집단이 존재하는 샘플에서, CCR8 발현의 대부분은 $FOXP3^{high}$ T 세포에서 발견된다. CCR8 발현 수준은 $FOXP3^{mid}$ 집단에서 유의하게 더 낮다. 일부 경우에, 대부분의 환자 $FOXP3^{+}$ T 세포는 높은 수준의 FOXP3을 나타낸다 (도 5, RCC). 이들 경우에, CCR8 발현은 FOXP3 발현과

중복된다. $\text{FOXP3}^{\text{mid}} \text{CD4}^+$ T 세포와 대조적으로, $\text{FOXP3}^{\text{high}} \text{CD4}^+$ T 세포가 진정한 Treg인 것으로 나타났으며, 이는 활성화된 통상적인 T 세포 또는 휴지기 Treg일 수 있다.

[0481] 실시예 7

[0482] CCR8^+ Treg는 면역억제성 분자를 과다발현하고 염증유발 마커를 과소발현한다

[0483] 종양-연관, CCR8^- 및 CCR4^- 발현 T 세포에 의한 면역억제 및 염증유발 단백질의 발현을 조사하기 위해, 밤새 전달에 의해 임상의로부터 수득한 절제된 폐 종양을 키트 (밀테니 바이오텍)를 사용하여 단일-세포 현탁액으로 효소적으로 소화시켰다. 해리된 종양 세포 현탁액을 10% FBS를 함유하는 RPMI 배지 (코닝) 중에서 밤새 휴지시켰다. 다음 날, 브레펠딘 A (BFA) 및 모넨신 (썬모피셔(ThermoFisher), 매사추세츠주 윌섬)을 첨가하여 37°C에서 단백질의 수송을 차단하면서, 포르볼 미리스테이트 아세테이트 (PMA) 및 이오노마이신의 존재 (세포 자극을 위함) 또는 부재 하에 세포를 4시간 동안 배양하였다. 4시간 배양 후에, 세포를 Treg 억제 및 염증과 연관된 표면 및 세포내 마커에 대해 염색하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다.

[0484] 도 6A-D는 환자 종양 내의 CCR8^+ Treg가 면역 억제 분자에 대해 풍부화되는 반면, CCR4^+ T 세포에서는 대등한 풍부화가 나타나지 않음을 보여준다 (도 7A-D). CD25^+ 세포의 대부분 (약 80%)이 CCR8^+ 분획에서 발견되는 반면, CD25^+ 세포의 20% 미만이 CCR8^- 분획에서 발견된다 (도 6A). 유사하게, 실질적으로 모든 CD39^+ 세포가 CCR8^+ 분획에서 발견되는 반면, 이 마커를 발현하는 세포의 40% 미만이 CCR8^- 세포이다 (도 6B). IL1R2 를 발현하는 세포의 약 3분의 1은 CCR8^+ 세포이지만, IL1R2 -발현 세포는 CCR8^- 분획에서 발견되지 않고 (도 6C), CCR8^+ 및 CCR8^- T 세포에서의 IL1R2 발현 사이의 차이는 자극된 T 세포에서 측정될 때 훨씬 더 크다 (도 6D). 따라서, 면역억제의 관점에서, 환자 종양 샘플로부터의 CCR8^+ T 세포는 CD25 , CD39 및 IL1R2 와 같은 억제 기능을 갖는 여러 단백질에 대해 풍부화된다. CD39 는 ATP를 AMP로 전환시킨 다음 아데노신으로 전환시키는 엑토뉴클레오티다제이며, 이는 T 세포에 대해 억제성인 반면 (Cekic et al., 2011), CD25 (IL-2 의 격리를 위해 Treg에 의해 사용되는 IL-2 수용체) 및 IL1R2 (IL-1 에 대한 디코이 수용체)는 잠재적으로 각각 염증유발 시토카인 IL-2 (Pandiyani et al., 2012) 및 IL-1D/E (Garlanda et al., 2013)에 대한 싱크로서 작용한다.

[0485] CCR8^+ 또는 CCR8^- 인 T 세포와 달리, CCR4^+ 및 CCR4^- T 세포에서는 CD25 (도 7A), CD39 (도 7B) 및 IL1R2 (도 7C 및 7D)의 발현 수준에서 보다 작은 차이가 존재한다. 따라서, CCR8^+ 세포의 표적화된 고갈은 CD25 , CD39 및 IL1R2 를 발현하는 면역억제 Treg를 제거할 것인 반면, CCR4 -표적화된 고갈은 이들 분자를 발현하는 Treg를 남길 것이다.

[0486] 활성화 마커로서 HLA-DR을 사용하여, CCR8 발현은 또한 보다 높은 수준의 HLA-DR 발현과 상관관계가 있고 (도 8A) 이에 의해 활성화된 Treg를 확인하지만, CCR4 발현은 그렇지 않다 (도 8B).

[0487] PMA 및 이오노마이신을 사용한 효소적으로 해리된 생체의 환자 종양 배양물의 자극은 CD4^+ T 세포의 CCR8^- 분획이 대다수의 $\text{IFN}\gamma^-$ (도 9A), IL-2^- (도 9B), 및 그랜자임 B- (도 9C) 생산 세포를 함유하였음을 밝혀내었다. 대조적으로, $\text{CCR4}^+ \text{CD4}^+$ T 세포는 본 검정에서 $\text{IFN}\gamma$ (도 10A) 및 IL-2 (도 10B)의 주요 생산자였으며, 이는 CCR4 -발현 세포의 표적화된 고갈은 항종양 면역에 유해할 수 있지만, CCR8 -발현 세포는 그렇지 않다는 것을 시사한다. CCR4^+ 및 CCR4^- T 세포는 대등한 수준의 그랜자임 B를 생산하였다 (도 10C).

[0488] 실시예 8

[0489] CCR8 에 대한 mAb의 생성

[0490] 항-hCCR8 mAb

[0491] 인간화, 키메라 또는 인간 항-CCR8 mAb는 일반 C57BL/6 마우스, 인간 Ig 레퍼토리를 발현하는 상이한 계통의 트랜스제닉 마우스, 및 또한 CCR8 녹아아웃을 보유하는 특이적으로 생성된 마우스 계통을 포함한 상이한 설치류를 다양한 인간 CCR8 (hCCR8) 항원으로 면역화시켜 생성하였다. 비-트랜스제닉 마우스에서 생성된 Ab의 선택물을 후속적으로 인간화 또는 키메라 Ab로 전환시켰다.

- [0492] CCR8 항원을 사용한 면역화
- [0493] hCCR8에 대한 Ab를 생성하기 위해, 2-5종의 설치류의 코호트를 hCCR8 항원으로 면역화시키고, 각각의 코호트를 CCR8 항원, 용량, 주사 경로, 아주반트, 동물 계통, 동물 연령, 및 면역화 시기의 특유한 조합을 포함하는 면역화 전략에 적용하였다. 58개 코호트에서 총 222마리의 동물을 면역화시켰다. 동형접합 CCR8 녹아웃 마우스 (C57BL/6으로부터 유래됨), 5종의 상이한 계통의 인간 Ig 트랜스제닉 마우스, 야생형 마우스 (BALB/C, C57BL/6), 및 아르메니안 햄스터를 면역화시켰다.
- [0494] 완전 또는 부분 hCCR8 단백질 서열을 함유하는 17종의 항원 조성물 중 하나 이상을 포함하는 매우 다양한 항원으로 면역화를 수행하였다. 전형적으로, 마우스를 발바닥 또는 꼬리 기저를 통해 최대 12회까지 $2-5 \times 10^6$ 개 CCR8 과다발현 세포 (형질감염된 또는 형질도입된 HEK 293F, BA/F3, 또는 CHO 안정한 세포주), 차등 원심분리를 통해 이들 세포로부터 단리된 형질 막-풍부화 분획, hCCR8을 일시적으로 과다발현하는 293 세포로부터 유래된 세제-가용화된, 지질-안정화된 CCR8 단백질 (프로테오리포솜, 비셀, 미셀), 또는 증진된 안정성을 위한 CCR8 막 횡단 돌연변이를 갖는 세포주 (아빌리타 바이오(Abilite Bio), 캘리포니아주 샌디에고)로 면역화시켰다. 세포 및 형질 막 분획을 사용한 유사한 면역화를 복강내 및 피하 주사를 통해 전달하였다.
- [0495] 많은 경우에, hCCR8의 N-말단 서열에 상응하는 2개의 술포티로신 잔기를 갖는 3-10 μ g의 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH)-접합된 35-잔기 펩티드를 항원으로서 사용하였다. 일부 경우에, 이러한 펩티드 서열에 대한 Ab 결합이 하류 검정에서의 효능과 연관되었기 때문에, 이러한 N-말단 펩티드가 CCR8 N-말단에 대한 Ab 반응을 강화 및 성숙시키는 것을 목표로 10-면역화 스케줄로 hCCR8 293F 세포와 함께 제3, 제5, 및 제7 용량에 제공되었다. 다른 경우에, 이러한 N-말단 펩티드는 모든 세포 또는 형질 막 분획 면역화와 조합하여 제공되거나, 또는 제공된 다른 항원 없이 단독으로 제공되었다.
- [0496] 일부 경우에, 마우스를 전정골근 및 사두근 근육내 주사를 통해 CCR8-코딩 DNA 플라스미드로 면역화하고, 이어서 이전에 기재된 세포 또는 N-말단 펩티드로 면역화하였다. CCR8의 제2 세포의 루프를 모방하는 구속성 펩티드, CCR8을 갖는 바이러스-유사 입자, 및 다른 재조합적으로 조작된 CCR8 물질 (아포지단백질, 및 증진된 안정성을 위한 CCR8 막횡단 돌연변이를 갖는 세포주)을 또한 사용하였다. 일부 세포- 및 형질 막-기반 항원을 피크릴술포산 (시그마-알드리치)을 사용하여 합텐-표지하여 면역원성을 증가시켰다. 일부 경우에, 교대 hCCR8 및 시노몰구스 CCR8 (cCCR8) 항원이 면역화 동안 제공되었다. 모노포스포릴 지질 A를 함유하는 RIBI 아주반트 (시그마-알드리치)는 전형적으로 항원과 1:1로 혼합된 면역화로 전달되거나, 또는 지질 이중층 및 CCR8 단백질 입체형태를 방해하지 않도록 인접한 주사로서 전달되었다. 동물은 18 내지 177일의 다양한 기간에 걸쳐 면역화를 받았다.
- [0497] 면역 반응을 모니터링하기 위해, 안와후 또는 꼬리 채혈로부터의 적정된 혈청을 전형적으로 4-6주의 면역화 후에 하기 기재된 바와 같이 유동 세포측정법 및 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 혈청을 다중 CCR8 과다발현 세포주, CCR8을 과다발현하지 않는 상응하는 음성 대조군 세포주, 및 소 혈청 알부민 (BSA)에 접합된 CCR8의 황산화 N-말단 펩티드에 대한 Ab 결합에 대해 스크리닝하였다. CCR8-특이적 및 CCR8 비-특이적 Ab 반응을 각각의 동물에서 측정하고, 항-CCR8 Ig의 충분한 역가를 갖는 동물을 하이브리도마 융합체를 생성하기 위해 희생 및 조직수거 6 및 3일 전에 최종 면역화를 위해 선택하였다. 다른 마우스 계통과 비교하여 CCR8 녹아웃 마우스에서 우수한 CCR8-특이적 Ab 역가가 관찰되었고, 래트 및 햄스터를 면역화시키는 데 있어서 제한된 노력은 또한 어떠한 Ab도 유도하지 않았다. KLH 담체 단백질에 접합된 CCR8의 황산화 N-말단 펩티드는 최상의 면역원 중 하나였고, 단독으로 또는 형질 막 분획과 조합하여 최상으로 작용하였다. 반대로, 모든 항원이 작용하지는 않았고; 예를 들어, 면역원으로서 아포지단백질 및 막 돌연변이체 세포주의 사용은 어떠한 Ab도 유도하지 않았다.
- [0498] CCR8에 대한 mAb를 생산하는 하이브리도마의 생성
- [0499] 비장 및 림프절을 포함한 림프성 기관을 상기 기재된 바와 같이 면역화된 마우스로부터 단리하였다. 가장 전형적으로, CCR8 면역원으로 발바닥 및 꼬리 기저부를 통해 면역화된 마우스로부터의 슬라, 서혜 및 장골 림프절을 수집하였다. 세포 융합 전기천공기 (BTX, 매사추세츠주 홀리스톤)를 사용하여 전기장-기반 전기융합에 의해 P3X63AgU.1 세포주 (ATCC CRL-1597)로부터 유래된 불멸화 마우스 골수종 세포와의 융합에 의해 하이브리도마를 생성하였다. 생성된 세포를 편평-바닥 마이크로타이터 플레이트에서 하이브리도마의 선택을 위해 아미노프테린 (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스)이 보충된 배지 E (스템셀 테크놀로지스(StemCell Technologies), 매사추세츠주 캠브리지) 중에 플레이트하였다.
- [0500] 항-mCCR8 mAb

- [0501] 상업적으로 입수가 가능한 래트 IgG2b 항-mCCR8 mAb의 이소형 (클론 SA214G2; 바이오레전드)을 가변 영역을 코딩하는 DNA를 2종의 상이한 pTT5 벡터 (캐나다 국립 연구 협의회) 내로 클로닝함으로써 mIgG2a 또는 mIgG1-D265A로 변화시키고, Expi293 발현 시스템을 사용하여 발현시켰다.
- [0502] 실시예 9
- [0503] 항-인간 CCR8 mAb의 스크리닝 및 선택
- [0504] 인간 CCR8에 선택적으로 결합하는 mAb에 대한 스크리닝
- [0505] hCCR8에 결합하는 mAb를 생성하기 위해, 인간 Ig 트랜스제닉 마우스를 포함한 설치류를 다양한 hCCR8 항원으로 면역화시키고, 실시예 8에 기재된 바와 같이 하이브리도마를 생성하였다. 10-13일의 배양 및 성장 배지 교체 후에, 하이브리도마 배양물 상청액을 개별 웰로부터 수집하고, 분비된 CCR8-특이적 Ab를 갖는 웰을 확인하기 위해 스크리닝하였다. 모든 상청액을 먼저 hCCR8을 과다발현하는 하나 및 CCR8을 과다발현하지 않는 상응하는 대조군 세포주인 적어도 2종의 세포주에 대해 스크리닝하였다. 세포 상의 Ab 결합을 인텔리시트 아이큐 스크리너 (Intellicyt iQue Screener) (사르토리우스(Sartorius), 뉴멕시코주 알버커키)를 사용하는 영상-기반 형광측정 미세부피 검정 기술 (FMAT) 스크리닝, 고처리량 384-웰 유동 세포측정법, 또는 부착 세포-기반 효소-연결 면역검정 (ELISA)을 통해 측정하였다. CCR8 Ab의 확인을 최대화하기 위해 초기 결합 검정을 때때로 병행 수행하였다. 66종의 하이브리도마 융합물 중 대략 157,250개의 배양물 웰로부터의 상청액을 hCCR8 Ab에 대해 스크리닝하였다.
- [0506] 양성 웰로부터의 하이브리도마를 새로운 배양 배지를 갖는 24-웰 플레이트로 옮기고, 2-3일 동안 성장시킨 다음, 유동 세포측정법에 의해 다시 스크리닝하여 CCR8에 대한 Ab 결합을 확인하였다. 간략하게, 75-100 μ l의 하이브리도마 배양물 상청액 및 CCR8-과다발현 세포 (예컨대 CHO 또는 293F) 또는 대조군 세포 (예컨대 GFP-CHO 또는 모 293F)를 30-60분 동안 공동-인큐베이션하고, 세척하고, AF647, APC 또는 PE에 접합된 항-마우스 IgG Fc 또는 항-인간 IgG Fc 2차 Ab (잭슨 이뮤노리서치, 펜실베이니아주 웨스트 그로브)와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 및 세척 후, 형광을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 항-hCCR8 Ab를 생산하는 대략 328종의 하이브리도마 클론이 확인되었고, 즉, 이들은 융합 대략 2주 후에 수득된 FACS⁺ 하이브리도마 상청액이었고, CCR8-발현 세포주에 대한 결합에 대해 초기 스크린에서 결합을 나타냈지만 대조군 세포주에 대해서는 그렇지 않은 저-친화도 결합제를 포함하였다. 다양한 이유로 진행성 Ab에서 높은 소모율이 존재하였고, 예를 들어 항-CCR8-생산 세포가 단리될 수 없을 때 클론이 상실되었고, 특정 클론은 CD16 가교 또는 Treg 고갈 검정에서 잘 수행되지 않았고, 일부 클론에서의 Ab 수율은 허용되지 않게 낮았고, 특정 Ab는 피할 수 없는 서열 문제를 함유하였다. 328종의 FACS⁺ 클론 중에서, 약 90종은 광범위하게 스크리닝되지 않았고, 나머지 중에서, 약 55종은 상세한 시험을 위해 인간 백본 내로 클로닝되는 단계로 진행되었다. mAb 4A19, 14S15, 18Y12, 16B13, 10R3 및 8D55를 포함한 이들 Ab 중 약 15%는 다양한 기능적 검정에서의 그의 성능에 기초하여 우수한 치료 후보인 것으로 간주되었다 (예를 들어, 실시예 11, 14, 15, 17, 19-23 및 25-29 참조). 따라서, CCR8-발현 세포의 고갈을 매개하는 Ab로서 본원에 기재된 Ab는 mAb 4A19, 14S15, 14S15h, 18Y12, 16B13, 10R3 및 8D55를 포함한다.
- [0507] 확인된 항-CCR8 특이적 Ab의 에피토프를 광범위하게 분류하기 위해, 배양물 상청액을 또한 ELISA에 의해 스크리닝하여 CCR8 N-말단 펩티드에 대한 결합을 측정하였다. 간략하게, 황산화 hCCR8 N-말단을 나타내는 BSA-접합된 펩티드 (2 μ g/ml)를 4°C에서 밤새 고-결합 96-웰 플레이트 (코닝) 상에 코팅하였다. 플레이트를 BSA로 차단하고 세척한 다음, 100 μ l의 배양물 상청액을 플레이트 진탕기 상에서 30-60분 동안 첨가하였다. 세척 후에, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)에 접합된 적절한 항-Fc 2차 Ab를 첨가하고, 플레이트를 ABTS 또는 HRP 기질 (서모딕스(SurModics), 미네소타주 에덴 프레리)로 발색시키고, 선라이즈(Sunrise) 마이크로플레이트 판독기 (테칸 (TECAN); 스위스 만네도르프) 상에서 405 또는 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. hCCR8에 대해 생성된 Ab는 ELISA에 의해 2개의 황산화 티로신 잔기를 갖는 BSA-접합된 N-말단 펩티드 서열에 우세하게 (그러나 독점적이지는 않음) 결합하였다. 이들 Ab 중에서, 단지 1개의 황산화 티로신을 함유하는 대안적 BSA-접합된 N-말단 펩티드에 대한 ELISA 결합은 일반적으로 크게 감소되었고, 티로신 잔기 중 어느 것도 황산화되지 않았을 때 결합은 일반적으로 상실되었다.
- [0508] 항-CCR8 Ab-분비 하이브리도마를 1회 또는 2회 서브클로닝하여 모노클론성을 보장하였다. 간략하게, 대략 700개의 생존 하이브리도마 세포를 하이브리도마-분비된 Ig를 검출하는 데 사용된 AF488-접합된 항-인간 또는 항-마우스 IgG Ab (잭슨 이뮤노리서치)를 갖는 반고체 메틸셀룰로스 배지 (스템셀 테크놀로지스) 5 ml 중에 플레이팅하였다. 7일 후, 바람직한 특성 (클론픽스2(ClonePix2) 시스템 (몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices),

캘리포니아주 산호세)에 의해 측정된 바와 같은 다른 콜로니로부터의 거리, IgG 분비 수준, 콜로니 크기, 및 콜로니 원형도)을 갖는 단일 세포로부터 발생한 하이브리도마 콜로니를 96-웰 플레이트 배양물에 골라내고, 2-4일 성장시켰다. 배양물 상정액을 이전에 기재된 바와 같이 유동 세포측정법에 의해 스크리닝하여 CCR8 Ab 결합을 확인하였다. 안정한 하이브리도마 서브클론을 시험관내에서 배양하여 친화도 정제 및 추가의 특징화를 위한 Ab를 생성하였다. Ab 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 DNA 서열을 표준 서열분석 기술 (생어(Sanger) 서열분석 및 차세대 서열분석)에 의해 획득하였다. Ab 아미노산 서열로부터의 예측된 질량을 질량 분광분석법을 통해 획득된 공지된 정제된 Ab 질량과 비교하여 서열분석 정확도를 보장하였다.

[0509] 전반적으로, 생성된 Ab를 스크리닝하는 데 있어서, 상기 기재된 바와 같은 CCR8에 대한 결합, 및 보다 중요하게는 CD16 가교 (실시예 17)는, 어느 Ab가 치료적 Ab로서 추가로 특징화될 가능성을 나타내는지를 결정하기 위해 초기 스크리닝에 사용된 2가지 주요 검정이었다. hCCR8-과다발현 293F 세포에 대한 Ab 상에서의 결합 적정 (실시예 11)은 일반적으로 강한 결합제 대 약한 결합제를 구별하였고, 약한 결합제는 전형적으로 기능적 검정에서 불량하게 수행되었으므로, 일반적으로 스크리닝의 다음 단계로 진행되지 않았다. 따라서, 이들은 칼때기에서의 다음 단계에 포함되지 않았다. 이들 검정에서 우수한 또는 중간 정도의 결합 또는 활성을 갖는 Ab를 1차 Treg에 대한 유사한 검정, 예를 들어 결합 (실시예 11), 칼슘 유동 (실시예 15) 및 NK-매개 ADCC (실시예 19)로 진행시켰으며, 후자는 Ab 유효성을 비교하고 선도 후보를 선택하는 데 가장 중요한 것 중 하나로 간주하였다. 1차 세포에 의해 제한되었기 때문에, 세포주-기반 CD16 가교 검정을 ADCC 대용물 검정으로서 사용하였으며, 이는 일반적으로 Treg ADCC/고갈 검정의 결과와 잘 상관된다 (실시예 19, 20 및 22).

[0510] 1차 Treg ADCC 검정에서, Y max (% 아넥신 V+ 세포)는 특정 Ab로서의 EC₅₀ 값보다 중요하지 않더라도 중요한 것으로 간주되었다. (특이적으로 결합하면서) 가장 높은 ADCC Ymax를 갖는 Ab는 대등한 EC₅₀을 갖지만 보다 낮은 Ymax를 갖는 Ab보다 우수한 것으로 간주되었다.

[0511] 실시예 10

[0512] 마우스 항-CCR8 mAb의 인간화

[0513] 마우스 항-CCR8 mAb의 4A19 mAb로의 인간화

[0514] 마우스 항-hCCR8 mAb를 조작하여 프레임워크를 가장 가까운 인간 배선 서열 (중쇄의 경우 hIgHV1-8*01 및 hIGJ4 및 경쇄의 경우 IGKV2D-30 및 hIGKJ2임)로 인간화시켰다. 여러 잠재적 서열 문제가 제거되었다. 중쇄 CDR1 내의 단일 쌍형성되지 않은 시스테인을 세린으로 돌연변이시켰다 (C35S). Asp-Gly 서열 모티프에서의 잠재적 이성질화 부위를 아스파르테이트를 글루타민으로 돌연변이시켰 (D52Q)으로써 제거하였다. 이 부위에서 4종의 다른 돌연변이를 시도하였고 (D52E, D52S, D52V, D52A), CCR8을 발현하는 Raji 세포주에 고친화도로 결합하는 능력에 기초하여 최상의 변이체 D52Q를 선택하였다. 아스파라긴을 아스파르테이트로 대체함 (N72D)으로써 중쇄 가변 도메인의 프레임워크 내의 잠재적인 글리코실화 부위를 제거하였다. 이러한 돌연변이는 27%의 빈도로 배선에서 발생하는 아스파르테이트에 기초하여 선택되었다. 경쇄의 CDR1 내의 발린은 페닐알라닌 (V27F)에 의해 대체되었고, 증가된 결합을 갖는 분자를 생성하였다. 생성된 mAb인 4A19는 모 9D7 Ab와 대등한 CCR8을 발현하는 Raji 세포에 대한 결합을 보여주었다 (각각 9D7 및 4A19에 대해 10 nM vs. 3 nM).

[0515] 표 3. 대표적인 항-hCCR8 mAb에 대한 기능적 특징화 데이터

mAb	mAb의 유형	면역원
4A19	비푸코실화 인간화 IgG1 항-hCCR8	hCCR8 293F 세포 (+KLH hCCR8-N-Sulf 펩티드, 3회 면역화) 인-셀-아트(In-Cell-Art) (프랑스 낭트)로부터의 hCCR8-코딩 DNA, 이는 검출가능한 항-CCR8 혈청 역가를 생성하지 않음, 이어서 KLH hCCR8-N-Sulf 펩티드
14S15 ^a	비푸코실화 키메라 마우스-인간 ^b 항-hCCR8	KLH hCCR8-N-Sulf 펩티드
18Y12	비푸코실화 키메라 마우스-인간 ^b 항-hCCR8	hCCR8 BAF3 형질 막 + KLH hCCR8-N-Sulf 펩티드
16B13	비푸코실화 IgG1 인간	hCCR8 BAF3 형질 막 + KLH hCCR8-N-Sulf 펩티드
2M18	인간 IgG1 항-hCCR8	CCR8 293 형질 막 + KLH/BSA N-Sulf-hCCR8 펩티드
15C17	인간 IgG1 항-hCCR8	CCR8 293 형질 막 + KLH/BSA N-Sulf-hCCR8 펩티드
13T20	인간 IgG1 항-hCCR8	hCCR8 BAF3 형질 막 + KLH hCCR8-N-Sulf 펩티드
10R3	인간 IgG1 항-hCCR8	hCCR8 BAF3 형질 막 + KLH hCCR8-N-Sulf 펩티드
8D55	인간 IgG1 항-hCCR8	hCCR8 BAF3 형질 막 + KLH hCCR8-N-Sulf 펩티드
1V11	인간 IgG1 항-hCCR8	hCCR8 BAF3 형질 막 + KLH hCCR8-N-Sulf 펩티드
11K16	인간 IgG1 항-hCCR8	hCCR8 BAF3 형질 막 + KLH hCCR8-N-Sulf 펩티드
12F27	비푸코실화 키메라 ^c (mFc/hFab)	hCCR8 293 형질 막 + KLH hCCR8-N-Sulf 펩티드

[0516]

[0517] ^a 본원에서 14S15로 지정된 mAb는 마우스 Fc 영역이 nf IgG1 인간 Fc로 대체된 마우스 항-hCCR8 mAb의 키메라 유도체를 지칭한다. 이러한 mAb의 인간화, 친화도 성숙, 및 서열 문제-고정 버전을 하기 본 실시예에 기재된 바와 같이 생성하였고, 이를 14S15h로 지정하였다.

[0518] ^b 이들 mAb는 인간 Fc 상에 그래프팅된 마우스 Fab를 포함하는 키메라 Ab이다.

[0519] ^c 이 mAb는 그것이 마우스 Fc 및 완전 인간 Fab를 포함하는 트랜스제닉 마우스에서 생성되었다는 점에서 반대의 의미로 키메라 Ab이다. 이들 마우스는 친화도 성숙을 돕기 위해 마우스 Fc를 포함하는 Ab를 생산하도록 설계되었다.

[0520] 생성된 항-CCR8 mAb의 대표적인 수를 표 3에 열거하였으며, 이는 mAb의 유형 및 이들을 생성하는 데 사용된 면역원을 나타낸다. 인간 항-hCCR8 Ab를 Expi293 발현 시스템 (써모 피셔 사이언티픽)을 사용하여 hIgG1 이소형으로서 재조합적으로 생산하였다. nf (hIgG1-nf) Ab를 Expi293 Fut8^{-/-} 세포에서 발현시켰다.

[0521] 표 3의 여러 Ab, 즉 mAb 2M18, 15C17, 13T20, 1V11, 11K16 및 12F27은 스크리닝 검정, 예를 들어 CD16 가교 및 Treg ADCC 검정에서 불량하게 수행된 Ab이고 (비교적 높은 EC₅₀ 값 및 비교적 낮은 Ymax 값), 따라서 유망하지 않은 치료 후보인 것으로 간주되었다. 그러나, 이들은 생성된 대다수의 CCR8-결합 Ab가 강력한 치료 후보인 것으로 간주되지 않았다는 사실을 강조하기 위해 표 3에 포함된다.

[0522] 마우스 항-CCR8 mAb의 14S15h mAb로의 인간화

[0523] 또 다른 마우스 항-CCR8 mAb를 조작하여 프레임워크를 가장 가까운 인간 배선 서열 (중쇄의 경우 hIGHV3-15 및 경쇄의 경우 IGKV2-18임)로 인간화시켰다. 프레임워크의 인간화는 SPR에 의해 측정된 바와 같이 인간 Fab의 결합의 감소로 이어졌다 (출발 마우스 Ab, 9G10에 대한 1.4 nM과 비교하여 4.2 nM의 K_D). 중쇄 가변 도메인의 친화도 성숙은 3종의 상이한 NNK 라이브러리, 및 200 nM, 50 nM, 10 nM 및 1 nM 비오틴화 CCR8 N-말단 펩티드

(아나스펙(Anaspec) (캘리포니아주 프리몬트) 유래) 및 증가하는 세척 엄격도를 사용한 4 사이클의 패닝을 사용하여 수행하였다. 중쇄 CDR1 영역에서의 N30G의 단일 치환은 친화도 성숙을 유발하였다. 또한, Asn-Gly 서열 모티프에서의 잠재적 탈아미드화 부위를 asn을 gln으로 돌연변이 (N28Q, 카바트 넘버링)시킴으로써 제거하였다. 생성된 친화도-성숙 인간화 항체 및 서열 불안정성-제거된 14S15h는 CCR8 N-말단 펩티드에 대해 완전히 회복되고 심지어 증가된 친화도를 가졌다 (14S15h Fab 단편에 대해 0.64 nM의 K_D). 14S15 mAb를 수반하는 본원에 기재된 검정은 표 3에 나타난 바와 같은 이 mAb의 키메라 버전이다.

[0524] 실시예 11

[0525] hCCR8-발현 세포에 대해 고친화도로 결합하는 항-CCR8 mAb

[0526] Treg에 대한 항-hCCR8 mAb의 결합에 대한 EC_{50} 값

[0527] 항-hCCR8 mAb를 활성화된 인간 Treg 또는 인간 CCR8-발현 세포주 (293F, CHO, Raji)와 함께 인큐베이션하였다. 이전에 단리되고 확장된 Treg로부터 제조된 활성화된 Treg를 100 유닛/ml의 제조합 인간 IL-2의 존재 하에 항-CD3/CD28 활성화 비드 (씨모피서)로 2일 동안 자극하였다. Ab를 30 μ g/ml의 출발 농도로부터 연속 희석하였다. 1차 항-CCR8 Ab에 대한 적절한 PE-접합된 2차 Ab (잭슨 이뮤노리서치)를 적용하고, 4°C에서 15분 동안 인큐베이션한 다음, 세척 제거하였다. 샘플을 유동 세포측정기 상에서 처리하고, 데이터를 플로우조를 사용하여 분석하고, 도 11에 제시하였다. 선택된 항-CCR8 mAb가 활성화된 Treg에 결합하는 것에 대한 EC_{50} 값을 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) (그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software), 캘리포니아주 라호야)을 사용하여 계산하였다.

[0528] 도 11에 나타난 바와 같이, 생성된 항-CCR8 mAb의 대표적인 샘플은 다양한 친화도를 갖는 다양한 hCCR8-형질감염된 세포주 및 활성화된 Treg에 대한 결합을 나타낸다. Ab는 일반적으로 CCR8-발현 세포주 (CHO, 293F, Raji)에 대한 그의 결합 친화도에 기초하여 초기에 스크리닝되었고, 대부분의 스크리닝된 Ab는 1 nM 미만의 반수-최대 유효 농도 (EC_{50})를 나타내는 것으로 밝혀졌다 (도 11A). 그러나, 이들 사전-스크리닝된 Ab를 활성화된 Treg에 대한 결합에 대해 시험한 경우에, 보다 넓은 범위의 결합 친화도가 관찰되었고, 절반 미만의 Ab가 1 nM 미만의 EC_{50} 으로 결합을 나타냈다 (도 11A). 피코몰 내지 나노몰 범위의 EC_{50} 값을 갖는 Ab의 선택된 하위세트가 도 11B에 제시되고, 각각의 EC_{50} 값이 표 4에 제공된다.

[0529] 표 4. 활성화된 Treg에 결합하는 항-CCR8 mAb의 친화도 (EC_{50})

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

[0530]

[0531] 18D55, 10R3, 14S15, 16B13, 4A19 및 18Y12를 포함하는 항-hCCR8 mAb가 종양-침윤 Treg의 ADCC를 도출하는 높은 잠재력을 갖거나 (실시예 17), 또는 종양-침윤 Treg의 효율적인 고갈을 직접적으로 도출하는 (실시예 19, 20 및 22) 것으로 나타났기 때문에, 활성화된 Treg 상의 CCR8에 nM 범위 (예를 들어, 약 20 nM 이하, 그러나 한계는 예를 들어 100 nM을 초과하여 더 높을 수 있음)의 친화도 (EC_{50})로 결합하는 Ab가 Treg 고갈을 효율적으로 매개할 수 있다는 것이 명백하다. 그러나, 종양-침윤 Treg를 특이적으로 표적화하는 치료제로서 유용하기 위해, CCR8에 대한 결합은 고도로 특이적이어야 한다 (CCR8에 높은 친화도로 결합하지만 또한 CCR8이 아닌 표적에도 강하게 결합하는 mAb 16B13 참조 (실시예 14)).

[0532] CCR8 N-말단 펩티드에 대한 항-CCR8 mAb, 4A19의 결합에 대한 K_D 값

[0533] 인간 CCR8의 N-말단 펩티드에 대한 mAb 4A19의 결합에 대한 해리 상수 (K_D)를 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해

측정하였다. SPR 측정을 HBST 완충제 (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% (1 g/l BSA 함유)) 중에서 37°C에서 비아코어(Biacore) T200 상에서 수행하였다. 고정화된 항-인간 카파 포획 pAb (서던 바이오테크 (Southern Biotech), 알라바마주 버밍햄), EDA (에틸렌 디아민)-차단된 CM4 칩. CCR8 Ab (Fab 및 mAb 둘 다) 를 포획하고, CCR8 N10 말단 펩티드 (200 nM, 40 nM, 8 nM 또는 1.6 nM)를 분석물로서 2분 동안 100 μ l/분의 유량으로 주입하였다. 모든 데이터를 이중-참조하고, 비아코어 T200 평가 소프트웨어 3.1을 사용하여 질량 전달을 갖는 1:1 랭뮤어 결합 모델에 피팅하였다. CCR8 잔기 1-35의 펩티드는 비-황산화되거나 (CCR8-nosulfo), Tyr15에서 황산화되거나 (CCR8-sulfoY15), Tyr17에서만 황산화되거나 (CCR8-sulfoY17), 또는 위치 Tyr15 및 Tyr17 둘 다에서 황산화되었고 (CCR8-2sulfo), 아나스펙(Anaspec) (캘리포니아주 프리몬트)에 의해 생산되었다.

[0534] 표 5. CCR8 N-말단에 결합하는 항-CCR8 mAb, 4A19, Fab 단편의 친화도 (K_D)

MAb	리간드	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
4A19	CCR8-2sulfo	2.5×10^7	4.1×10^{-2}	1.6×10^{-9}
4A19	CCR8-sulfoY17	4.3×10^6	8.4×10^{-2}	2.0×10^{-8}
4A19	CCR8-sulfoY15	대략적인 추정:		$\sim 1.3 \times 10^{-6}$
4A19	CCR8-nosulfo	결합 없음		

[0535]

[0536] 표 5에 요약된 결과는 4A19 Fab 단편이 1.6 nM의 K_D 로 CCR8 N-말단에 결합한다는 것을 보여준다. 비-술포일화 펩티드가 4A19 Fab 단편에 대한 어떠한 결합도 나타내지 않기 때문에 술포일화 티로신이 결합에 요구된다. Y15 상의 술포일화의 부재는 (CCR8-sulfoY17) 이중으로 술포일화된 펩티드와 비교하여 친화도의 대략 10배 감소를 유도하는 반면, Y17 상의 술포일화의 부재 (CCR8-sulfoY15)는 4A19 결합의 대략 1,000배의 감소를 유도한다 (표 5).

[0537] 실시예 12

[0538] CCR8 N-말단 펩티드에 결합된 4A19의 결정 구조

[0539] 단일 황산화 펩티드에 대한 4A19 Fab의 결합

[0540] 4A19 중쇄의 Fab 영역 (도메인 VH 및 CH1)을 8His 태그에 융합시키고, pTT5 벡터 내로 클로닝하였다. 이러한 변형된 4A19 중쇄 및 4A19 경쇄를 포함하는 4A19 Fab 단편을 HEK 세포에서 발현시켰다. 상청액을 니켈 친화도 칼럼 상에서 정제하고, 용리액을 포스페이트-완충 염수 (PBS)로 완충제-교환하고, 10 mM 트리스 pH 7.4, 150 mM NaCl을 함유하는 구동 완충제를 사용하여 크기 배제 칼럼 (지이 슈퍼텍스-200) 상에서 사이징하였다. 적절한 주요 피크를 풀링하고, 7-10 mg/ml로 농축시켰다. Y17만이 황산화된 인간 CCR8의 잔기 1-35를 바이오-신테시스 (Bio-Synthesis) (텍사스주 루이스빌)에 의해 화학적으로 합성하였다. 동결건조된 펩티드를 10 mM 트리스 pH 7.4, 150 mM NaCl 중에 용해시키고, 4A19 Fab 단편과 5:1 몰비로 혼합하였다. 단백질 용액을 동등한 부의 25% PEG3350과 혼합함으로써 결정화를 수행하고, Al's 오일을 사용하여 동결보호하였다. 결정을 공간군 C2에서 2.03 Å의 분해능으로 회절시켰다. 수집된 데이터를 XDS를 사용하여 인덱싱하고, ccp4i를 사용하여 스케일링 및 말단절단하고, refmac5를 사용하여 정밀화하였다.

[0541] 도 12A는 2.03 Å 분해능으로 CCR8 N-말단 펩티드 (막대 표현으로 제시됨)에 결합된 4A19 Fab 단편 (표면 표현으로 나타냄)의 결정 구조를 제시하며, 이는 4A19에 의해 결합된 에피토포프가 그의 중심에 황산화 티로신-17을 갖는 CCR8의 잔기 15-21을 포함함을 밝혀낸다.

[0542] 이중 황산화 펩티드에 대한 4A19 Fab의 결합

[0543] 4A19 Fab 단편을 이전 섹션에 기재된 바와 같이 생산하였다. Y15 및 Y17 둘 다가 황산화된 hCCR8의 잔기 1-35로 이루어진 펩티드를 아나스펙에 의해 화학적으로 합성하였다. Fab 단편을 50 mM NaCl, 10 mM 트리스 pH 8.0으로 완충제 교환하고, 이중으로 황산화된 펩티드를 Fab 단편에 2배 몰 과량으로 첨가하였다. 결정을 12.8 mg/ml로 농축된 단백질 샘플 200 nL를 모액 (0.2 M 아세트산암모늄, 20% PEG 3350, pH 7.2) 200 nL와 혼합함으로써 20°C에서 시팅-드롭 증기 확산에 의해 성장시켰다. 결정은 7일 이내에 나타났고, x선 회절 데이터를 어드밴스드 포톤 소스(Advanced Photon Source)에서 빔라인 17-ID (IMCA-CAT)에서 1.80 Å 분해능으로 수집하였다. 데이터를 XDS를 사용하여 공간군 P21에서 처리하고, 구조를 페이저(Phaser)로의 분자 대체에 의해 결정하고, 페

닉스(Phenix)로 정밀화하였다.

- [0544] 도 12B는 CCR8 N-말단 펩티드 (막대 표시로 나타냄)에 결합된 4A19 Fab 단편 (표면 표시로 나타냄)의 결정 구조를 나타낸다. 4A19 Ab는 위치 Y15 및 Y17에서 둘 다의 tyr 술페이트 잔기를 인식한다. CCR8 에피토프에 대한 분자 상호작용은 PISA 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. CCR8 잔기 V12, D14, Y(SO3)15, Y16, Y(SO3)17, P18, I20, F21, 및 S22는 4A19 Fab 단편과 복합체화될 때 > 3 Å²의 접근가능한 표면적의 변화를 나타낸다.
- [0545] 실시예 13
- [0546] mCCR8-발현 세포에 대한 항-mCCR8 mAb의 결합
- [0547] mCCR8-발현 CHO 세포에 대한 항-CCR8-mIgG2a mAb의 결합
- [0548] 항-CCR8-mIgG2a (상업용 래트 항-mCCR8 mAb [바이오레전드 클론 SA214G2]의 마우스 IgG2a 이소형, 본원에 개시된 ADCC-유도 항-hCCR8 치료적 Ab에 대한 대용물로서 본원에 사용됨)를 30 µg/ml의 출발 농도로부터 연속 희석하고, 5 x 10⁵개 mCCR8-발현 CHO 세포와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 세척한 다음, 얼음 상에서 30분 동안 항-마우스 IgG, PE-접합된 2차 Ab (잭슨 이뮤노리서치)로 염색하였다. 세포를 세척하고, 유동 세포측정기 상에서 분석하였다. 평균 형광 강도를 플로우조를 사용하여 계산하였다. 그래프패드 프리즘을 사용하여 계산된 EC₅₀은 6.44 nM인 것으로 결정되었다. 이는 hCCR8-발현 CHO 세포와의 결합에 대해, 약 0.05 nM인 상기 분석된 많은 항-hCCR8 Ab의 EC₅₀보다 상당히 더 높다.
- [0549] 마우스 흉선세포 및 1차 활성화된 마우스 비장 Treg에 대한 항-CCR8 mAb의 결합
- [0550] 마우스 흉선세포 및 마우스 비장세포로부터의 1차 활성화된 Treg에 대한 항-CCR8-mIgG2a의 결합을 유동 세포측정법에 의해 검정하였다. 흉선 T 세포는 CCR8을 구성적으로 발현하는 반면, CCR8 발현은 비장 Treg 상에서 유도된다. 마우스 비장세포 상에서 CCR8 발현을 유도하기 위해, CD4⁺ T 세포를 분리하고, 3:1 비의 항-CD3/CD28 비드 및 2,000 U/ml의 재조합 마우스 재조합 IL-2 (rIL-2)로 활성화시켰다. 동일한 날에 분리된 흉선 CD4⁺ T 세포, 또는 48시간 동안 활성화된 CD4⁺ 비장 T 세포를 항-CCR8-mIgG2a 또는 항-KLH-mIgG2a 대조군 Ab의 적정물과 혼합하였다. 세포 표면 CCR8에 대한 Ab의 결합을 형광 표지된 항-마우스 IgG Ab에 의해 검출하였다. 상대적인 세포 결합을 형광 접합된 2차 Ab에 대해 양성인 총 CD4 세포의 빈도로서 측정하였다.
- [0551] 항-mCCR8 Ab는 흉선 CD4⁺ 세포 (EC₅₀ = 4 nM) 및 활성화된 마우스 비장 CD4⁺ 세포 (EC₅₀ = 6.16 nM)의 표면 상의 CCR8에 결합하는 것으로 나타났다.
- [0552] 실시예 14
- [0553] 상이한 항-hCCR8 mAb의 조직 교차-반응성
- [0554] 항-hCCR8 mAb인 18Y12, 16B13 및 4A19를 1 및 3 µg/ml에서 CCR8-발현 세포주, PBMC, 및 다양한 조직 유형 (n=1-2/각각)에 대한 결합에 대해 시험하였다.
- [0555] CCR8 형질감염체
- [0556] 모든 3종의 Ab는 hCCR8-형질감염된 CHO 및 293F 세포주에 강하게 결합하였다 (데이터는 제시되지 않음). 이들 형질감염된 세포주를 후속 조직 염색 실험에서 양성 대조군으로서 사용하였다.
- [0557] 정상 인간 PBMC
- [0558] 도 13A에 제시된 바와 같이, mAb 18Y12 및 4A19는 PBMC에 결합하지 않았다. 그러나, 16B13은 CCR8이 아닌 표적에 대한 강한 결합을 나타냈다. 16B13이, 예를 들어 활성화된 Treg에 고친화도로 결합하는 것 (실시예 11), CCR8-발현 세포에 의한 칼슘 유동을 효율적으로 억제하는 것 (실시예 15), 및 높은 ADCC 잠재력 또는 활성을 나타내는 것 (실시예 17 및 19)에서 매력적인 성질을 나타내지만, 이러한 mAb를 사용하여 관찰된 PBMC에 대한 비-특이적 결합은 요법에서의 이의 사용이 CCR8을 발현하지 않는 종양-침윤 Treg이외의 세포의 오프-타겟 고갈과 관련된 문제를 제시할 것임을 가리킨다.
- [0559] 다양한 인간 조직 유형
- [0560] mAb 18Y12 및 4A19를 대뇌, 소뇌, 심장, 간, 폐, 신장, 편도, 비장, 흉선, 결장, 위, 췌장, 부신, 뇌하수체, 피

부, 말초 신경, 고환, 자궁, 및 PBMC 도말표본 (n=1-2/각각)을 포함한 18종의 정상 인간 조직 유형의 패넬에 대해 시험하였고, hCCR8-발현 CHO 및 293F 세포를 양성 대조군으로서 사용하였다.

- [0561] 양성 염색은 주로 흉선의 수질 (도 13B; 18Y12-좌측 패넬 및 4A19-우측 패넬) 및 피부의 진피에서 희귀하고 산란된 면역 세포 (데이터는 제시되지 않음)에서 관찰된 반면, 검사된 다른 조직에서는 양성 염색이 관찰되지 않았다 (데이터는 제시되지 않음). 유사한 발현 프로파일이 마우스 종양 모델에서 관찰되었다 (데이터는 제시되지 않음).
- [0562] mAb 16B13을 대뇌, 소뇌, 심장, 간, 폐, 신장, 편도, 비장, 흉선, 결장, 위, 췌장, 부신, 갑상선, 뇌하수체, 피부, 말초 신경, 전립선, 고환, 자궁 및 PBMC 도말표본 (n=1-2/각각)을 포함한 21종의 정상 인간 조직 유형의 패넬에 대해 시험하였으며, hCCR8-형질감염된 CHO 세포를 양성 대조군으로서 사용하였다.
- [0563] 가장 현저한 염색은 주로 림프성 기관 (흉선 [도 13B; 중간 패넬], 편도, 비장) 및 림프성-풍부 조직 (결장 및 소장; 데이터는 제시되지 않음)에서 면역 세포에서 관찰되었다. 염색은 대다수의 면역 세포에서, 특히 림프구-풍부 영역에서 강하고 확산되었으며 (예를 들어, 비장에서의 적색 속질보다 백색 속질에서 훨씬 더 강한 염색), 우세한 세포질 및/또는 핵주위 패턴을 가졌다. 이러한 염색은 간에서의 쿠퍼 세포, 폐에서의 폐포 대식세포, 및 신장의 사구체에서의 혈관간-유사 세포를 포함한, 면역 세포가 존재하는 많은 조직에서 관찰되었다.
- [0564] PBMC 도말표본에서, 비-고정 (그러나 공기-건조된) 도말표본에서는 염색이 관찰되지 않거나 최소로 관찰된 반면, 아세트-고정 (즉, 투과화된) 슬라이드에서는 핵주위 및 세포질 염색이 관찰되었는데, 이는 양성 표지화가 세포내라는 관찰을 추가로 뒷받침해준다.
- [0565] 장 (소장, 결장, 위)의 근육 내의 평활근 세포, 피부 내의 수축기 필리 근육, 및 전립선의 기질, 뿐만 아니라 대부분의 조직 내의 혈관계에서 강하고 확산된 염색이 (주로 더 높은 3 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서) 또한 관찰되었다. 염색은 세포질 패턴을 나타냈다.
- [0566] 대뇌 및 소뇌 내의 뉴런 및 신경교 세포, 뿐만 아니라 신경뇌하수체 내의 세포의 하위세트 및 말초 신경 내의 방추 간질 세포에서 강하고 확산된 핵주위 및/또는 세포질 염색이 나타났다.
- [0567] 심장에서의 중피, 신장에서의 원위 또는 집합 세관 상피의 하위세트, 뇌하수체에서의 내분비 세포, 폐에서의 기도 상피, 췌장에서의 관 상피, 고환에서의 정세관 상피의 기저 층, 및 자궁의 자궁내막에서의 선 상피를 포함한 상피 세포의 하위세트에서 강하고 확산된 세포질 염색이 또한 관찰되었다. 염색은 대부분의 경우에 고농도 (3 $\mu\text{g/ml}$)에서 보다 현저한 경향이 있었다.
- [0568] 실시예 15
- [0569] 항-hCCR8 mAb는 hCCR8-발현 세포에 대한 hCCL1의 결합을 차단한다
- [0570] 항-hCCR8 mAb에 의한 hCCR8에 대한 hCCL1 결합의 차단을 hCCR8-발현 CHO 세포 (hCCR8-CHO)에 대한 칼슘 (Ca) 유동 검정을 수행함으로써 시험하였는데, 이는 CHO 세포 상의 CCR8의 CCL1 결속이 칼슘 유동을 유도하기 때문이다. hCCR8-CHO를 시딩하고, FLIPR 칼슘 6 염료 (몰레큘라 디바이시스) 및 프로베네시드 (써모 피셔 사이언티픽)의 존재 하에 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 상이한 항-CCR8 mAb를 세포에 첨가하고, 실온에서 15분 동안 방치한 후, 10 nM의 재조합 인간 CCL1 (알앤디 시스템즈, 미네소타주 미네아폴리스)을 첨가하였다. Ca 유동 형광 신호를 FLIPR 테트라 시스템 (몰레큘라 디바이시스)을 사용하여 최대-최소에 의해 측정하였다. 반수-최대 억제 농도 (IC_{50})를 그래프패드 프리즘을 사용하여 계산하였다.

[0571] 표 6. 항-CCR8 mAb에 의한 CCR8-발현 세포 상의 칼슘 유동의 차단

항-CCR8 MAbs	IC ₅₀ (nM)
4A19	0.4645
16B13	0.2600
18Y12	0.2314
14S15	1.331
KLH-g1fnf	N/A
리톡시맙 (항-CD20)	N/A

[0572]

[0573] CCR8에 대한 CCL1 결합을 차단하는 능력은 Treg에 대한 항-억제 효과를 가질 수 있고, 이 기능은 항-CCR8 치료 적 Ab 후보를 선택하는 데 선택 기준으로서 사용되었다. 시험된 항-hCCR8 mAb의 약 52% (96개 중 50개)가 hCCR8-CHO 세포 상의 CCL1 결합을 차단하였다 (도 14A). 이들 Ab의 선택된 하위세트는 CCR8-CHO 세포의 CCL1-유도된 Ca 유동을 51%-94% 차단하였다 (도 14B). hCCR8-CHO에 대한 Ca 유동의 차단에 대한 IC₅₀ 곡선은 4종의 선택 항-CCR8 mAb에 대해 도 14C에 제시되고 (IC₅₀ 범위 0.23 nM 내지 1.331 nM), 이들 mAb에 대한 IC₅₀ 값은 표 6에 제시된다.

[0574] 실시예 16

[0575] 항-mCCR8 mAb는 mCCR8-발현 세포에 대한 mCCL1의 결합을 차단한다

[0576] 항-CCR8-mIgG2a에 의한 mCCR8에 대한 mCCL1 결합의 차단을, hCCR8-CHO 대신에 mCCR8-CHO를 사용한 것을 제외하고는 실시예 15에 기재된 바와 같이 mCCR8-발현 CHO 세포 (mCCR8-CHO)에 대한 Ca 유동 검정을 수행함으로써 시험하였다. 그래프패드 프리즘을 사용하여 계산된 IC₅₀은 19.34 nM인 것으로 결정되었다.

[0577] 항-CCR8-mIgG2a가 인간 사용을 위해 설계된 항-CCR8 Ab의 치료 효능을 시험하기 위한 적절한 마우스 대용물 Ab로서의 역할을 하기 위해, 이러한 마우스 Ab가 그의 hCCR8 Ab 대용물과 유사한 기능적 특징을 나타내는 것이 중요하다. hCCL1-유도된 Ca 유동을 억제하는 항-hCCR8 mAb와 유사하게 (도 14, 표 6), 항-CCR8-mIgG2a는 mCCR8-CHO 세포에서 mCCL1-유도된 Ca 유동을 억제하는 것으로 밝혀졌지만, 실시예 15에서 시험된 항-hCCR8 Ab에 대해 관찰된 약 0.2 nM 내지 1.3 nM의 IC₅₀ 값에 비해 19.34 nM의 IC₅₀ 값으로 덜 효율적이었다.

[0578] 실시예 17

[0579] CD16 가교의 능력에 의해 측정된 항-hCCR8 mAb의 ADCC 잠재력

[0580] 항-hCCR8 mAb의 ADCC 잠재력을 CD16 발현 리포터 세포의 가교를 매개하는 이들 Ab의 능력에 의해 측정하였다. 활성화된 인간 Treg 또는 hCCR8-발현 Raji 세포를 항-CCR8 Ab 또는 대조군 Ab의 존재 하에 4시간 동안 37°C에서 CD16-발현 Jurkat NFAT 루시페라제 리포터 세포와 1:5 비로 공동-배양하였다. 바이오-글로(BIO-GLO)TM (프로메가(Promega), 위스콘신주 매디슨)를 세포에 첨가하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션한 다음, 루시페라제 활성의 측정을 위해 발광을 판독하였다. 반수-최대 유효 농도 (EC₅₀)를 그래프패드 프리즘을 사용하여 계산하였다.

[0581] NK 세포는 Fc-γ 수용체 3A (CD16)의 결속 또는 가교를 통해 ADCC를 매개한다. 표적 세포 (hCCR8-발현 Raji 세포 또는 활성화된 인간 Treg)의 ADCC를 매개하는 항-hCCR8 mAb의 능력을 상기 기재된 바와 같이 CD16-발현 세포주에 의해 측정하였다. 인간 IgG1 (hIgG1) 백본으로 시험한 항-hCCR8 mAb의 16%는 표적으로서 CCR8-발현 Raji 세포와 80-100%의 최대 CD16 결속을 보였다 (도 15A). 선택된 mAb를 nf hIgG1 포맷 (hIgG1-nf)으로 변형시키고, 동일한 방식으로 스크리닝하였다.

[0582] 표 7. 항-CCR8 mAb에 의한 CD16 발현 리포터 세포의 가교

항-CCR8 MAb	EC ₅₀ (pM)
8D55	6.58
10R3	3.02
14S15	8.02
16B13	0.67
4A19	0.69
18Y12	0.698

[0583]

[0584] 대부분의 이들 항-CCR8 hIgG1-nf mAb는 80-100% CD16 가교를 달성하였다 (도 15A). 시험된 항-CCR8 hIgG1-nf mAb의 27%는 표적 세포로서 활성화된 인간 Treg와 최대 CD16 결속을 달성하였다 (도 15A). 시험된 항-hCCR8 hIgG1-nf mAb의 선택 세트의 CD16 가교 능력에 대한 EC₅₀ 값이 도 15B 및 표 7에 제시된다.

[0585] 실시예 18

[0586] 마우스 FcgIV4⁺ 리포터 세포의 가교의 능력에 의해 측정된 항-mCCR8 mAb의 ADCC 잠재력

[0587] CCR8-발현 세포의 ADCC-매개 사멸을 유도하는 항-CCR8-mIgG2a의 능력을 마우스 FcgRIV⁺ 리포터 세포 (프로메가)의 가교를 유도하는 그의 능력을 측정함으로써 간접적으로 평가하였다. 본 검정에서, 반딧불이 루시페라제를 발현하는 FcgRIV⁺ 이펙터 세포를 마우스 비장세포로부터의 1차 활성화된 Treg 또는 mCCR8-발현 CHO 세포와 1:5 비로 공동-배양하였다. 세포를 항-CCR8-mIgG2a, 불활성 백분을 갖는 항-CCR8-mIgG1-D265A, 또는 항-KLH-mIgG2a 대조군 Ab의 적정물의 존재 하에 37°C에서 4시간 동안 공동-배양하였다. 표적 세포 사멸 활성은 바이오글로(BIO-GLO)TM (프로메가) 루시페린 기질과 세포의 인큐베이션시 생성된 생물발광 신호 (RLU)의 증가를 나타내는 FcgRIV⁺ 이펙터 세포의 가교 및 활성화로서 측정하였다.

[0588] 이펙터 세포의 특이적 가교가 관찰되었고 (EC₅₀ = 6.34 nM), 이는 항-CCR8-mIgG2a의 보다 높은 농도에서 높은 루시페라제 신호에 의해 나타났다. 이는 Ab가 표적 세포에 결합하였고, 이펙터 세포에서 FcgRIV에 결속되었음을 나타냈다. 이러한 상호작용의 특이성을 비-표적 특이적 Ab (항-KLH-mIgG2a) 및 비-FcγRIV-결속 Ab (항-CCR8-mIgG1-D265A)를 사용함으로써 평가하였고, 이들 중 어느 것도 루시페라제 신호전달을 나타내지 않았다.

[0589] 실시예 19

[0590] 항-CCR8 mAb는 Treg의 NK 세포-매개 세포독성을 촉진한다

[0591] 증진된 이펙터 기능을 나타내는 비푸코실화 항-hCCR8 mAb를, 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조된, 활성화된 Treg 세포의 NK 세포-매개 아포토시스를 촉진하는 그의 능력에 대해 시험하였다. 이펙터로서 사용하기 위한 동종 NK 세포를 전혈로부터 PBMC의 피콜 구배 분리, 이어서 비-NK 세포를 제거하기 위한 자기 비드 음성 선택 (밀테니 바이오텍, 캘리포니아주 서니베일)을 사용하여 분리하였다. NK 세포를 신선한 건강한 공여자 PBMC (인간 NK 세포 분리 키트, 밀테니 바이오텍)로부터 분리하고, NK 세포 활성화를 증가시키기 위해 1 μM 히드로코르티손 (스텝셀 테크놀로지스) 및 500 U/ml의 재조합 인간 IL-2 (페프로테크, 뉴저지주 크랜버리)를 함유하는 미엘로컬트(Myelocult) H5100 배지 (스텝셀 테크놀로지스)에서 24시간 동안 배양하였다.

[0592] NK 세포를 셀트레이스 바이올렛 (써모 피셔 사이언티픽)으로 형광 표지하고, 10% 초저 IgG FBS 및 1 mM 피루브산나트륨을 함유하는 RPMI 배지 중에서 5:1의 비로 Treg 세포와 혼합하였다. 항-hCCR8 Ab 및 이소형 대조군 Ab의 적정물을 첨가하고, 37°C에서 3시간 동안 세포와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 Ca²⁺을 함유하는 완충제 중 아넥신-V FITC-접합된 Ab 및 7-AAD로 염색하고, 세포 형광을 BD 포르테사 X-20 세포측정기 (비디 바이오사이언시스, 캘리포니아주 산호세)를 사용하여 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 총 Treg 중 아포토시스 Treg의 백분율 (아넥신-V 양성, 셀트레이스 바이올렛 음성)을 표준 유동 세포측정법 분석을 통해 결정하였다.

[0593] 항-hCCR8-hIgG1-nf mAb의 존재 하에 동종 NK 세포에 의한 활성화된 인간 Treg의 ADCC를 사용하여 중앙-침윤 Treg의 고갈을 매개하는 항-CCR8 Ab의 능력을 평가하였다. CCR8 결합 (실시예 9), CCL1 차단 (실시예 15) 및

CD16-가교 검정 (실시예 17)을 통해 항-hCCR8 Ab의 보다 큰 풀을 스크리닝한 후, Ab의 하위세트를 NK 세포를 통해 활성화된 Treg의 ADCC를 매개하는 그의 능력에 대해 평가하였다. 선택된 항-hCCR8-hIgG1-nf Ab에 의해 유도된 아포토시스에 적용된 세포의 중앙 백분율이 도 16에 도시되어 있으며, 이는 이들 백분율이 대략 34% 내지 99%의 범위라는 것을 보여준다. 상이한 항-CCR8 Ab에 의해 매개되는 동종 NK 세포에 의한 활성화된 Treg의 사멸에 대한 EC₅₀ 값을 표 8에 제시하며, 값은 약 13 pM 내지 304 nM 범위이다.

표 8. 항-CCR8 mAb에 의해 매개되는 활성화된 Treg의 ADCC 사멸

항-CCR8 MAb	중앙 EC ₅₀ (pM)
8D55	38.6
10R3	56.6
14S15	39.7
16B13	13.4
4A19	13.1
18Y12	18.6
12F27	3.04 x 10 ⁵

실시예 20

항-CCR8 mAb는 환자 종양에서 Treg의 고갈을 촉진한다

비파괴화된 항-hCCR8 mAb를 인간 환자로부터의 중앙 Treg의 NK 세포-매개 아포토시스를 촉진하는 그의 능력에 대해 시험하였다. 간략하게, 해리된 환자 자궁내막 종양을 디스커버리 라이프 사이언스로부터 구입하였다. 건강한 공여자로부터의 NK 세포를 분리하고, 실시예 19에 기재된 바와 같이 ADCC에 대해 밤새 프라임하고, 형광 표지하였다 (셀트레이스 바이올렛, 써모피셔). 이어서, 이들 NK 세포 (1.875 x 10⁵개 세포/웰)를 자궁내막 종양 세포 (2.5 x 10⁵개 세포/웰)와 함께 37°C에서 10% 초저 IgG FBS 및 1 mM 피루브산나트륨을 함유하는 RPMI 배지 중에서 항-hCCR8 (14S15) 및 대조군 Ab (항-CCR4 mAb, 모가물리주맵, 및 항-KLH-nf 이소형)의 적정물과 함께 24시간 동안 인큐베이션하였다. 생성된 세포를 Treg 및 다른 림프구 집단에 대해 염색하고, 유동 세포측정기를 통해 처리하였다. Treg 및 통상적인 T 세포 빈도를 플로우조 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

항-hCCR8 Ab가 환자 종양-침윤 Treg의 ADCC를 특이적으로 매개할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 동종 NK 세포를 종양-침윤 Treg를 함유하는 소화된 자궁내막 종양 세포와 공동-배양하였다. 항-CCR4-hIgG1nf Ab인 모가물리주맵은 암 환자에서 Treg 사멸을 매개할 수 있는 것으로 이전에 밝혀졌다. 도 17에 나타난 바와 같이, 모가물리주맵 및 항-CCR8 mAb인 14S15 둘 다는 중앙 Treg 사멸을 유도하며, 14S15가 더 강력하다 (도 17A). mAb 14S15는 자궁내막 종양 Treg를 특이적으로 고갈시키지만 (도 17A), 통상적인 CD4⁺FOXP3⁻ T 세포는 고갈시키지 않는다 (도 17B). 대조적으로, 모가물리주맵은 또한 CD4⁺FOXP3⁻ 통상적인 T 세포를 고갈시킨다. 14S15는 임의의 다른 림프구 하위세트를 고갈시키지 않는다 (데이터는 제시되지 않음).

추가 실험에서, 하기 인간 중쇄 변이체를 갖는 hCCR8에 대한 여러 Ab를 생성하였다: 1) hIgG1; 2) IgG1보다 유의하게 더 높은 FcγR 결합 친화도를 나타내고 ADCC/ADCP에 대해 CD16에의 결합에 대해 내인성 IgG를 능가할 수 있는 nf IgG1 (IgG1-nf) (Iida, 2006); 및 3) FcγR과 최소로 결속하는 IgG1-L234A-L235E-G237A (hIgG1-불활성) (Hezareh et al., 2001). IgG1-nf Ab로서의 항-인간 CCR8 클론 16B13 및 14S15는 시험관내 활성화된 인간 FOXP3⁺ Treg에 결합하였고, CCL1 결합을 차단하였으며, 활성화된 Treg 상의 CCR8에의 결합시 CD16에 가교되었다 (실시예 11, 15 및 17; 문헌 [Campbell et al., 2021], 여기서 16B13은 CCR8.1로 지정되고, 14S15는 CCR8.2로 지정됨). 클론 16B13-IgG1은 또한 그의 IgG1-nf 대응물보다 더 낮은 효력에도 불구하고 CD16을 가교할 수 있는 반면 (Campbell et al., 2021), 16B13-IgG1-불활성은 CD16 가교를 전적으로 매개할 수 없었다 (Campbell et al., 2021).

이어서, 말초 혈액 및 1차 인간 종양 시편으로부터 FOXP3⁺ Treg를 고갈시킬 수 있는 항-hCCR8-IgG1-nf Ab의 능력을 결정하였다. U-바닥 96-웰 플레이트 (코닝)에서 배양 배지 중 2.0 x 10⁵개 PBMC 및 100 U/ml IL-2 (페프

로테크)를 37℃에서 48시간 동안 인큐베이션함으로써 PBMC 고갈 검정을 수행하였다. 2일 후, 관련 Ab를 첨가하고, 세포를 96시간 동안 추가로 인큐베이션한 후, 유동 세포측정 분석을 수행하였다.

[0602] 14S15-IgG1-nf가 말초 혈액 Treg의 하위세트를 고갈시켰지만 (50% 미만) (도 18A), nf 항-인간 CCR4 Ab (항-hCCR4-IgG1-nf, 모가몰리주맵 바이오시밀러)는 이들 세포의 90% 초과 (도 18A) 뿐만 아니라 말초 CD4⁺ Tconv의 대략 절반 (도 18B)을 제거하였다. 어떠한 Ab도 CD8⁺ T 세포 집단에 영향을 미치지 않았다 (도 18C). 따라서, 항-hCCR8-IgG1-nf Ab로의 활성화된 PBMC의 처리는 말초 혈액 Treg의 하위세트를 고갈시키지만, 중요하게는 Teff 세포를 고갈시키지 않는다. 유방암 환자에서, TCR 서열분석은 말초 혈액 CCR8⁺ Treg와 종양 Treg 사이의 유의한 클론 중첩을 밝혀냈으며 (Wang et al., 2019), 이는 (1) 말초로부터의 Treg 클론이 종양 내로 이동하고 확장되어 Treg 억제제를 정립시키거나, 또는 (2) 종양 미세환경으로부터의 활성화된 Treg가 말초로 확장됨을 시사한다. 두 시나리오는 동시에 발생할 수 있고, CCR8⁺ Treg를 종양 전이 부위 내로 순환시킴으로써 침윤을 유도하여 면역 억제제를 매개할 수 있다. 메카니즘과 무관하게, 이들 결과는 CCR8⁺ Treg의 전체적인 고갈이 말초 또는 종양에서 종양 특이적 Treg를 전신적으로 제거하는 방법으로서의 역할을 할 수 있음을 시사한다.

[0603] 생체의 종양 샘플에서 항-CCR8-매개 고갈을 시험하기 위해, NSCLC 외과적 절제의 세포 현탁액을 건강한 공여자 혈액으로부터의 활성화된 동종 NK 세포와 함께 배양하였다. 14S15-IgG1-nf의 첨가는 전체 CD4⁺ Tconv (도 18E) 또는 CD8⁺ T 세포 빈도 (도 18F)에 대한 어떠한 영향도 없이 FOXP3⁺ Treg의 빈도의 감소를 발생시켰다 (도 18D). 대조적으로, 항-hCCR4-IgG1-nf는 Treg 고갈 (도 18D)에 추가로 CD4⁺ Tconv의 약 30%를 고갈시켰다 (도 18E). 16B13-IgG1-불활성으로의 처리 후에 Treg 고갈이 관찰되지 않았다 (도 18G).

[0604] 동종 NK 세포의 부재 하에 생체의 환자 종양 샘플에서 Treg를 고갈시키는 16B13-IgG1-nf 및 4A19의 능력을 시험하였다. 16B13 연구를 위해, 신선한 투명 세포 신세포 암종 (RCC) 및 위 종양 조직을 한천에 감싸고, 순차적 300-μM 두께 슬라이스를 콤프레스툼(COMPRESSTOME)® 진동 마이크로톰 (프리시저너리 인스트루먼트즈 (Precisionary Instruments); 노스캐롤라이나주 그린빌)을 사용하여 모든 종양 조직이 슬라이스될 때까지 생성하였다. 조직 절편을 1 mM 피루브산나트륨 및 55 nM 2-메르캅토에탄올 (써모 피셔 사이언티픽)이 보충된 10% FBS를 갖는 5 ml의 RPMI 1640 세포 배양 배지 (코닝)를 함유하는 6-웰 조직 배양 플레이트에서 2개의 콜라겐 지혈제 (벡톤 디킨슨(Becton Dickinson), 로드 아일랜드주 워릭) 조각 사이에서 배양하였다. 슬라이스 배양물을 80 rpm으로 회전하는 플레이트 진탕기 상에서 37℃에서 인큐베이션하여 배지 관류를 용이하게 하였다. 24시간 후, 슬라이스 배양 웰을 16B13-IgG1-nf 또는 항-KLH-nf hIgG1 이소형 대조군으로 처리하였다. mAb와 함께 3일 인큐베이션한 후, 종양 조직 슬라이스를 키트 (밀테니 바이오텍)를 사용하여 단일-세포 현탁액으로 효소적으로 해리시키고, 유동 세포측정 분석을 위해 염색하였다. CD4⁺ T 세포 중 FOXP3⁺ Treg의 백분율을 결정하였다.

[0605] 도 18H 및 18I에 나타난 바와 같이, 16B13-IgG1-nf로의 신세포 및 위 종양의 처리는 동종 NK 세포의 첨가 없이 생체의 환자 종양 슬라이스 배양 시스템에서 Treg 세포의 빈도의 대략 50% 감소를 나타냈고, 이는 내인성 종양-상주 FcγR⁺ 세포가 계내 CCR8⁺ 표적 세포에 대한 ADCC/ADCP를 매개하는 데 충분하다는 것을 확인시켜 준다.

[0606] 4A19 연구를 위해, 절제된 흑색종 종양을 슬라이싱하고, 3일 동안 10 μg/ml의 4A19, 모가몰리주맵 바이오시밀러, 또는 항-KLH-nf hIgG1 이소형 대조군과 함께 배양하였다. 3일 후, 처리된 종양 슬라이스를 유동 세포측정 분석을 위해 단일 세포 현탁액으로 해리시켰다. 전체적으로, 4A19로 처리된 종양 슬라이스는 모가몰리주맵 바이오시밀러- 및 이소형-처리된 슬라이스와 비교하였을 때 FOXP3⁺ CD4 Treg의 감소된 백분율을 나타냈다.

[0607] 실시예 21

[0608] 항-CCR8 mAb는 CCR8의 세포 내재화를 유도하지 않는다

[0609] 항-CCR8 Ab가 세포 표면 상의 CCR8에의 결합시 CCR8 수용체의 내재화를 유도하는지 여부를 결정하기 위해, 실시예 2에 기재된 바와 같이 Treg를 활성화시켰다. 항-CCR8 mAb (4A19), 양성 대조군 Ab (항-ICOS Ab), 및 이소형 대조군을 각각 10 μg/ml의 농도로 4 x 10⁴개 활성화된 Treg에 첨가하고, 37℃에서 5가지의 시간 주기 동안 인큐베이션하였다: 0, 30, 60, 90, 및 120분. 또한, 염소 항-인간 Fc-γ Ab를 샘플의 하위세트에 5 μg/ml로 첨가하여 1차 Ab를 가교시켰다. 각각의 시간 주기 후에, 아지드화나트륨 용액을 Treg에 첨가하고, 혼합물을 얼음 상에 두어 추가의 수용체 내재화를 방지하였다. 최종적으로, 모든 샘플을 0.05% 아지드화나트륨 용액으로 2

회 세척한 다음, 적절한 피코에리트린 (PE)-접합된 2차 Ab로 염색하였다. 세포를 2% 파라포름알데히드 (PFA)로 고정시킨 다음, 세포측정기 상에서 분석하였다. 플로우조 소프트웨어를 사용하여 결정된 중앙 형광 강도에 의해 세포 표면 상의 CCR8 발현 수준을 측정하였다.

- [0610] 도 19에 제시된 바와 같이, 가교 Ab의 부재 하에 항-ICOS mAb는 120-분 시간 주기에 걸쳐 ICOS의 최소 내재화를 유발하였지만, 가교 Ab의 존재 하에 유의한 ICOS 내재화를 유발하였다. 대조적으로, 항-CCR8 mAb인 4A19는 가교 Ab의 존재 또는 부재 하에 CCR8의 내재화를 유발하지 않았다. 가교 2차 Ab의 존재 또는 부재 하에 이소형 Ab에 의한 활성화된 Treg의 처리는 CCR8의 내재화를 유발하지 않았다.
- [0611] 실시예 22
- [0612] 시험관내 인간 중앙 Treg의 고갈
- [0613] 공여자 자연 킬러 (NK) 세포를 분리하고, 미엘로컬트 H5100 (스텝셀), 1 μ M 히드로코르티손, 및 500 U/ml의 IL-2 (페프로테크)를 사용하여 24시간 동안 활성화시켰다. 동결된 해리된 인간 폐 선암종 조직 (디스커버리 라이프 사이언시스)을 해동시키고, 항-hCCR8 (mAb 4A19), 항-hCCR4 hIgG1-nf (모가몰리주맙 바이오시밀러), 또는 대조군 nf 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH-nf) mAb의 존재 하에 24시간 동안 2.5×10^5 개 동종 NK 세포와 1:1 비로 생체외 공동-배양하였다. 세포를 염색하고, Treg 고갈을 플로우조 소프트웨어를 사용하여 유동 세포측정법에 의해 측정하여 세포 집단을 계산하였다.
- [0614] 도 20에 제시된 바와 같이, mAb 4A19는 Teff의 빈도 또는 수에 영향을 미치지 않으면서 중앙 Treg의 측정가능한 고갈을 유도하였다. 이는 소화된 환자 중앙 및 환자 중앙 슬라이스 체외이식편 시스템을 사용한 동종 NK 사멸 검정에서 입증되었다. mAb 4A19는 시험관내에서 항-CCR4-nf Ab보다 Treg 고갈에서 더 효과적이었다 (도 20A). 또한, 항-CCR4-nf Ab와 달리, mAb 4A19는 $CD4^+$ 이펙터 T 세포의 고갈을 유도하지 않았다 (도 20B). 항-CCR8도 항-CCR4도 $CD8^+$ 이펙터 T 세포를 고갈시키지 않았다 (도 20C).
- [0615] 비관련 표적화 아암 (항-KLH-nf) 또는 불활성 백본 (항-CCR8-불활성)을 갖는 Ab는 Treg를 고갈시키지 않았으며, 이는 nf 백본을 통한 표적-매개 $Fc\gamma R$ 공동결속이 Treg 고갈에 요구된다는 것을 시사한다 (도 20D).
- [0616] 실시예 23
- [0617] 항-CCR8 mAb는 CT26 마우스 중앙 모델에서 중앙 성장을 감소시킨다
- [0618] 항-PD-1 처리에 저항성인 다양한 마우스 중앙 모델, 즉 동계 CT26, MC38 및 SA1N 모델, 뿐만 아니라 중앙 모델 MB49 및 4T1을 사용하여 항-CCR8 mAb의 효과를 시험하였다. 모든 Ab 처리를 200 μ g/마우스에서 수행하고, 중앙을 모든 연구에 대해 매주 2회 측정하였다.
- [0619] 항-mCCR8 mAb (항-CCR8-mIgG2a)의 항중앙 활성을 CT26 마우스 결장 선암종 모델에서 평가하였다. 15주령 암컷 BALB/cAnNHsd 마우스에 각각 10^6 개 CT26 중앙 세포를 피하 (SC) 이식하였다. 중앙이 대략 100 mm³의 중앙 크기에 도달하였을 때인 중앙 이식 7일 후에 마우스를 10마리 마우스/군의 처리군으로 무작위화하였다. PBS 중에 제제화된 Ab (항-CCR8-mIgG2a 또는 대조군 mIgG2a 이소형 Ab)를, 이식 후 제7일, 제10일, 및 제14일에 IP 주사를 통하여 200 μ g/마우스로 200 μ l의 부피로 투여하였다. 중앙 부피, 체중 및 임상 관찰을 시험 작용제의 효능 및 내약성을 확립하기 위해 기록하였다. 중앙 캘리퍼 측정치를 하기 식을 사용하여 중앙 부피로 전환시켰다: 부피 = 1/2 (길이 x 폭 x 높이). 중앙 측정을 이식후 최대 35일 동안 1주에 2회 기록하였다. 연구시, 마우스에게 멸균 설치류 사료 및 물을 자유롭게 제공하였고, 12시간 명/암 사이클 하에 멸균 필터-탑 (filter-top) 케이지에 수용하였다. 모든 마우스 실험은 실험 동물 관리 평가 인증 협회 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International)의 가이드라인에 따라 수행하였다.
- [0620] 데이터는 항-CCR8-mIgG2a가 중앙 성장 속도를 강력하게 감소시켰으며, 10마리의 마우스 중 8마리가 이식후 제28일까지 무중앙인 반면, 대조군 mIgG2a Ab로의 처리는 중앙 성장을 억제하지 않았음을 나타낸다 (도 21A). 마우스 중앙 모델에서 수행된 실험의 경우, Ab의 마지막 투여 후 ≥ 25 일 동안 중앙 재발에 대해 무중앙 마우스를 모니터링하였다. 대조군-처리된 마우스에 대한 측정은 중앙 이식 약 35일 후에 중단하였고, 그 후에 나머지 마우스를 안락사시켰다. 처리된 마우스의 평균 중앙 부피를 도 21B에 나타냈고, 이는 항-CCR8 mAb에 의한 중앙 성장의 강한 억제 및 이소형 대조군으로 처리된 중앙의 억제되지 않은 성장을 확인시켜 준다. 이러한 데이터는 항-CCR8 Ab가 이러한 CT26 마우스 모델에서 중앙 성장을 억제하는 데 고도로 효과적이고, 중앙-침윤 Treg의 고

갈과 연관된다는 것을 나타낸다.

- [0621] 종양-침윤 림프구의 분석을 위해, 마우스 종양을 이식 16일 후에 수거하였다. 종양을 콜라게나제로 소화시키고, 옥토맥스(OctoMacs) 해리기 (밀테니 바이오테크)를 사용하여 기계적으로 해리시키고, 멸균 100- μ M 스트레이너를 통해 여과하였다. 샘플을 FcR 차단 시약 (밀테니 바이오테크)과의 인큐베이션에 의해 Fc 수용체에 대해 차단한 후, 림프구 집단에 대해 표면 염색, 고정, 투과화 및 Foxp3에 대해 세포내 염색을 수행하였다. 이어서, 세포를 세척하고, 유동 세포측정기를 통해 처리하였다. 플로우조 소프트웨어를 사용하여 분석을 수행하고, 그래프패드 프리즘을 사용하여 그래프화하였다.
- [0622] 도 21C에 나타난 바와 같이, CT26 종양을 보유하는 마우스의 항-CCR8-mIgG2a로의 처리는 이소형 대조군으로 처리된 마우스와 비교하여 $CD4^{+}$ T 세포 집단에서 Foxp3⁺ Treg의 백분율을 대폭 감소시킨 반면, 비장에서의 Treg 집단은 항-CCR8-mIgG2a로의 처리에 의해 영향을 받지 않았다 (도 21D). 이들 데이터는 CCR8이 종양-연관 Treg의 표면 상에서 특이적으로 발현되지만, 말초 Treg 상에서는 발현되지 않고, 추가로, CCR8에 대한 Ab의 결합이 ADCC에 의한 종양-연관 Treg의 고갈을 매개한다는 것을 나타낸다.
- [0623] 실시예 24
- [0624] 항-mCCR8은 종양 Treg만의 고갈을 매개하며, 정상 조직에서 CCR8⁺ T 세포를 보존한다
- [0625] 무린 조직 림프구 집단을 CT26 마우스 결장 선암종 모델에서 평가하였다. 암컷 BALB/C 마우스에 10⁶개 CT26 종양 세포를 피하 주사하였다. 캘리퍼에 의해 측정된 종양 부피가 약 100-150 mm³에 도달하였을 때인 12일 후에 마우스를 종양 크기에 의해 처리군으로 무작위화하였다. 마우스를 이식 후 제12일, 제14일, 및 제19일에 200- μ g 균일 용량 (평균 21.2 g 체중의 마우스의 경우 대략 10 mg/kg)의 항-CCR8-mIgG2a 또는 mIgG2a 이소형 대조군 mAb를 3회 투여하였다. 제20일에, 제3 Ab 용량 24시간 후에, 마우스를 희생시키고, 혈액 샘플을 수집하고, 종양, 피부, 비장 및 흉선 조직을 절제하였다.
- [0626] 유동 세포측정법을 위해 조직을 단일-세포 현탁액으로 처리하였다. 종양을 세절하고, 효소적으로 소화시키고, 비장 및 흉선 조직을 기계적으로 해리시키고, 해리된 비장 및 혈액 샘플 내의 RBC를 실시예 2에 기재된 바와 같이 고갈시켰다. 가공된 조직으로부터의 세포 현탁액을 FcR 차단 시약 (밀테니 바이오테크)과의 인큐베이션에 의해 Fc 수용체에 대해 차단한 후, 림프구 집단에 대해 표면 염색, 고정, 투과화, Foxp3에 대해 세포내 염색을 수행하였다. 이어서, 세포를 세척하고, 유동 세포측정기를 통해 처리하였다. 플로우조 소프트웨어를 사용하여 분석을 수행하고, 그래프패드 프리즘을 사용하여 결과를 그래프화하였다.
- [0627] 마우스 CT26 종양에 침윤하는 T 세포 중에서, $CD4^{+}FOXP3^{+}$ Treg (Treg)는 $FOXP3^{-}CD4^{+}$ 이펙터 ($CD4^{eff}$) 또는 $CD8^{+}$ T ($CD8T$) 세포와 비교하여 CCR8 발현에 대해 가장 풍부하였다 (도 22A). CCR8 발현은 또한 피부-상주 T 세포의 집단에서 관찰되었고, 비장 또는 혈액 내의 T 세포에서는 거의 발현되지 않았다 (도 22A). 흉선에서, CCR8은 $CD4^{+}CD8^{-}$ (단일 양성) 흉선세포의 하위세트 상에서 발현되었다 (도 22B). 항-CCR8-mIgG2a로의 처리 후에, 종양 침윤 Treg는 고갈된 반면, 비장, 혈액 및 피부 내의 Treg는 고갈되지 않았다 (도 22C). 흉선세포 (도 22D) 뿐만 아니라 피부 내의 $CD4^{+}$ (도 22E) 및 $CD8^{+}$ (도 22F) T 세포가 또한 영향을 받지 않았다. 따라서, 마우스 CT26 종양 모델에서, 항-mCCR8 고갈 Ab로의 처리는 종양에서 CCR8⁺ Treg를 선택적으로 고갈시켰지만, 피부, 흉선, 비장 또는 혈액에서 비교적 적은 수의 CCR8⁺ T 세포는 그렇지 않았다.
- [0628] 실시예 25
- [0629] 항-CCR8 mAb는 MC38 마우스 종양 모델에서 종양 성장을 감소시킨다
- [0630] 항-CCR8-mIgG2a의 항종양 활성을 MC38 마우스 결장 선암종 모델에서 측정하였다. 15주령 암컷 FOXP3_IRES-EGFP (C57BL/6) 마우스 (잭슨 래보라토리, 메인주 바 하버)에 각각 10⁶개 MC38 종양 세포를 SC 이식하고, 종양 이식 7일 후에 10마리 마우스/군의 처리군으로 무작위화하였다. Ab (항-CCR8-mIgG2a 또는 대조군 mIgG2a Ab)를 이식후 제7일, 제10일 및 제14일에 IP 주사를 통해 200 μ l의 부피로 200 μ g/마우스로 투여하였다. 종양 측정을 이식후 51일까지 1주에 2회 기록하고, 그 후 마우스를 안락사시켰다. 데이터 분석 및 그래프화를 그래프패드 프리즘을 사용하여 수행하였다.
- [0631] 데이터는 항-CCR8-mIgG2a가 종양 성장 속도를 강력하게 감소시켰으며, 10마리의 마우스 중 7마리가 이식후 제51

일까지, 억제되지 않은 성장을 나타내는 종양에 대한 $1,100 \text{ mm}^3$ 초과의 평균 부피와 비교하여, 10 mm^3 미만의 종양 부피를 가진 반면, 대조군 mIgG2a Ab로의 처리는 종양 성장을 억제하지 않았음을 나타낸다 (도 23A). 처리된 마우스의 평균 종양 부피를 도 23B에 나타냈고, 이는 항-CCR8-mIgG2a에 의한 종양 성장의 강한 억제 및 이소형 대조군으로 처리된 종양의 억제되지 않은 성장을 확인시켜 준다. 이러한 데이터는 항-CCR8 Ab가 이러한 MC38 마우스 모델에서 종양 성장을 억제하는 데 고도로 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0632] 실시예 26

[0633] MC38 마우스 종양 모델에서의 항-CCR8 mAb 처리에 대한 약역학적 및 약동학적 반응

[0634] C57BL/6 마우스에 1.0×10^6 개 MC38 세포를 SC 주사하였다. 종양을 캘리퍼로 2차원적으로 측정하고, 종양 부피를 $L \times (W^2/2)$ 로서 계산하였으며, 여기서 L = 길이 (2회 측정 중 더 긴 것)이고, W = 폭이다. 마우스를 약 77 mm^3 의 평균 종양 부피에 도달하였을 때 각각 25마리 마우스 (이소형 대조군의 경우 21마리 마우스)의 6개 군으로 무작위화하고, 표 9에 제시된 용량으로 이식후 제10일에 PBS 중에 희석된 항-CCR8-mIgG2a 또는 mIgG2a 이소형 대조군을 IP 주사에 의해 투여하였다. 동물을 매일 자세, 털손질 및 호흡 변화, 뿐만 아니라 기면에 대해 체크하였다. 종양 및 군 체중을 사망, 안락사 또는 연구 기간의 종료까지 1주에 적어도 2회 기록하였다. 종양이 대략 $2,000 \text{ mm}^3$ 초과의 부피에 도달하거나 궤양화된 것으로 보이면 동물을 안락사시켰다.

[0635] 종양-침윤 림프구에 대한 항-mCCR8 mAb의 효과를 조사하기 위해, 종양 ($n = 7$ 마리 마우스/처리군)을 처리후 제3일, 제5일 및 제10일에 수거하였다. 종양으로부터의 단일 세포 현탁액을 젠틀MACS C 튜브를 사용하여 수득하였다. 세포 현탁액을 $70\text{-}\mu\text{m}$ 필터에 통과시킨 후, 펠릿화하였다. 재현탁 후, 바이-셀(Vi-cell) 계수기 (베크만 쿨터(Beckman Coulter), 플로리다주 마이애미)를 사용하여 세포를 계수하였다. 이어서, 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 3.0×10^6 개 세포로 플레이팅하고, 유동 세포측정법 Ab를 사용하여 면역 세포 하위세트 및 기능적 마커에 대해 염색하였다. Ab 형광을 포르테사(Fortessa) X-20 세포측정기 (비디 바이오사이언시스) 상에서 유동 세포측정법에 의해 검출하고, 결과를 플로우조 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0636] 항-mCCR8 mAb의 약동학 (PK)을 평가하기 위해, 투여 후 4, 24, 72, 120, 168 및 240시간에 꼬리 채혈 또는 말단 채혈에 의해 전혈 샘플 ($n = 4$ 마리 마우스/시점)을 수득하였다. 혈액 샘플을 응고시키고, 4°C 에서 원심분리하여 ($1,500$ 내지 $2,000 \times g$) 혈청을 수득하였다. 분석할 때까지 혈청 샘플을 -80°C 에서 보관하였다. 항-mCCR8 mAb의 검출을 위해 면역-포획 LC-MS/MS를 사용하여 마우스 혈청 샘플을 분석하였다. 기준 물질을 사용하여 보정물(calibrator) 및 품질 관리 샘플을 제조하였다. 항-mCCR8 mAb 보정 곡선의 범위는 마우스 혈청에서 200 내지 $200,000 \text{ ng/ml}$ 였다. 정량화의 상한 및 하한은 각각 $200,000$ 및 200 ng/ml 였다 (즉, ULOQ $200,000 \text{ ng/ml}$, LLOQ 200 ng/ml). PK 파라미터는 피닉스 윈논린(Phoenix WinNonlin) 소프트웨어 (세르타라(Certara), 캘리포니아주 덴로 파크)를 사용하여 혈청 농도 대 시간 데이터의 비-구획 분석에 의해 수득하였다. 제0 시점으로부터 마지막 샘플링 시간까지의 곡선하 면적 [AUC (0-T)] 및 제0 시점으로부터 무한대까지의 곡선하 면적 [AUC (INF)]을 선형 및 로그 사다리꼴 합의 조합을 사용하여 계산하였다. CLT, V_{ss} , 및 $T_{1/2}$ 를 IP 투여 후에 추정하였다. 구체적으로, CLT는 약물의 총 클리어런스이고, V_{ss} 는 정상-상태에서의 (약물) 분포의 부피이다. 반감기 ($T_{1/2}$)의 추정은 정량가능한 농도로 최소 3개의 말단 시점을 사용하여 이루어졌다.

[0637] 실시예 25의 결과와 일치하게, 단일 용량의 항-mCCR8 mAb로의 처리는 MC38 모델에서 종양 성장을 감소시켰다. 처리후 제10일에, 평균 종양 부피는 도 24A 및 표 9에 제시된 바와 같았다.

[0638] 표 9. 항-CCR8 mAb에 의해 매개되는 활성화된 Treg의 ADCC 사멸

군	Ab 처리 (용량)	제10일에서의 종양 부피 (mm ³)	Treg의 %	CD8 ⁺ T 세포의 %
1	대조군 (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

[0639]

[0640] MC38 모델에서의 면역-표현형결정 연구는 항-mCCR8이 용량-의존적 방식으로 Treg 고갈을 유도한다는 것을 추가로 나타냈다. 처리후 제5일에, 0.03 및 0.1 mg/kg의 보다 낮은 용량의 항-mCCR8로 처리된 마우스에서의 Treg의 평균 (± SD) 백분율 (Foxp3⁺/CD4⁺ T 세포 %)은 이소형 대조군-처리군의 것과 대등하게 유지되었다 (도 24B; 표 9 참조).

[0641] 처리후 제5일에, 종양-침윤 CD8⁺ T 세포의 빈도 (%)는 도 24C; 표 9에 제시된 바와 같이 이소형 대조군-처리군에 비해 항-mCCR8 mAb-처리군에서 증가하였다.

[0642] 항-CCR8-mIgG2a의 단일 IP 용량은 0.03 내지 3 mg/kg의 투여 범위에서 비-선형 PK를 나타내며, 이는 표적-매개 약물 배치 (TMDD)를 나타낸다. 0.3 mg/kg 투여와 비교하여, T_{1/2}는 1 및 3 mg/kg 용량에 대해 T_{1/2}와 비교하여 대략 3배만큼 증가한다 (도 24D).

[0643] 실시예 27

[0644] 항-CCR8 및 항-PD-1 mAb는 MB49 마우스 방광 암종 종양 모델에서 종양 성장을 상승작용적으로 감소시킨다

[0645] 항-mPD-1 단일요법에 덜 반응성인 것으로 공지된 MB49 무린 방광 암종 모델에서 항-CCR8-mIgG2a의 항종양 활성을 단일 작용제로서 또는 항-mPD-1 Ab (클론 4H2)와 조합하여 측정하였다. 마우스를 또한 대조군 mIgG2a Ab로 또는 4H2 단독으로 처리하였다. 항-mPD-1 클론 4H2는 Fc-부분이 마우스 IgG1 이소형으로부터의 Fc-부분으로 대체되어 마우스 FcR에 대한 결합이 감소된 mAb를 생성하는 래트 IgG2a 항-마우스 PD-1 Ab로부터 구축된 키메라 래트-마우스 항-mPD-1 mAb이다 (Li et al., 2009). 이는 mPD-1에 대한 mPD-L1 및 mPD-L2의 결합을 차단하고, T 세포 반응을 자극하고, 마우스에서 항종양 활성을 나타내며, 이전에 기재된 바와 같이 생성되고 (Li et al., 2009), CHO 세포에서 발현되었다.

[0646] 15주령 수컷 C57BL/6 Foxp3-IRES-EGFP 마우스에게 2 x 10⁵개 MB49 종양 세포를 SC 주사하고, 종양 이식 9일 후에 10마리 마우스/군의 처리군으로 무작위화하였다. mAb를 이식후 제10일, 제13일 및 제18일에 IP 주사를 통해 200 µg/마우스로 투여하였다. 종양 측정을 제39일까지 1주에 2회 기록하고, 그 후에 마우스를 안락사시켰다.

[0647] 종양-침윤 림프구의 분석을 위해, 마우스 종양을 이식 17일 후에 수거하였다. 종양을 콜라게나제로 소화시키고, 옥토맥스(OctoMacs) 해리기 (밀테니 바이오테크)를 사용하여 기계적으로 해리시키고, 멸균 100-µM 스트레이너를 통해 여과하였다. 샘플을 FcR 차단 시약으로 Fc 수용체에 대해 차단한 후, 림프구 집단에 대해 표면 염색하였다. 이어서, 세포를 세척하고, 유동 세포측정기를 통해 처리하였다. 플로우조 소프트웨어를 사용하여 분석을 수행하고, 그래프패드 프리즘을 사용하여 그래프화하였다.

[0648] 도 25A에 나타난 바와 같이, 단일-작용제 항-CCR8 및 항-PD-1 처리가 마우스 MB49 종양 모델에서 부분적인 항종양 활성을 유도하였고, 항-CCR8 mAb가 항-PD-1 mAb보다 더 강한 효과를 가졌다. 그러나, 항-CCR8 및 항-PD-1 mAb를 조합하여 투여하는 것은 종양 성장을 거의 완전히 억제하는 데 있어서 상승작용적 효과를 가져, 10마리의 마우스 중 8마리가 무종양이 되게 하였다. 이는 항-PD-1 처리가 덜 면역원성인 종양 모델에서 항-CCR8의 항종양 활성을 상승작용적으로 증진시킬 수 있다는 것을 입증한다. Ab의 조합은 조합물의 항종양 효과가 각각의 Ab에 의해 개별적으로 나타난 억제 수준의 합보다 더 큰 경우에 상승작용적인 것으로 간주된다.

[0649] 도 25B는 다양한 Ab 처리 후의 Treg인 종양-연관 CD4⁺ T 세포의 백분율을 나타낸다. 항-CCR8 단일 작용제 및

항-CCR8/항-PD-1 조합 치료 둘 다에서 종양 Treg의 유사한 고갈 수준에도 불구하고, 단일-작용제 항-CCR8 치료 부문은 종양 성장을 억제하는 데 불충분하였다.

[0650] 도 25C는 다양한 Ab 처리 후의 $CD8^+$ T 세포인 종양-연관 $CD45^+$ T 세포의 백분율을 나타낸다. $CD8^+$ T 세포 확장 수준은 단일-작용제 및 조합 부문에 대해 유사한 것으로 밝혀졌다. 그러나, $CD8^+$ T 세포 반응의 품질은 조합 치료에 의해 개선될 수 있다.

[0651] 실시예 28

[0652] 항-CCR8 및 항-PD-1 mAb는 4T1 유방암 모델에서 종양 성장을 상승작용적으로 감소시킨다

[0653] 항-mPD-1 단독요법에 저항성인 또 다른 마우스 종양 모델인 4T1 유방 암종 모델에서 항-CCR8-mIgG2a의 항종양 활성을 단일 작용제로서 또는 항-PD-1 Ab (클론 4H2)와 조합하여 측정하였다. 마우스를 또한 4H2 단독으로 및 대조군 mIgG2a 및 mIgG1-D265A Ab의 조합물로 처리하였다. 15주령 암컷 Balb/C 마우스 (엔비고(Envigo), 인디애나주 인디애나폴리스)에게 10^6 개 4T1 종양 세포를 SC 주사하고, 종양이 대략 100 mm^3 의 종양 크기에 도달하였을 때 종양 이식 7일 후에 군당 10마리 마우스의 처리군으로 무작위화하였다. Ab를 이식 후 제7일, 제10일 및 제14일에 IP 주사를 통해 $200\text{ }\mu\text{g}$ /마우스로 투여하였다. 종양 측정을 제27일까지 1주에 2회 기록하고, 그 후에 마우스를 안락사시켰다. 데이터 분석 및 그래프화를 그래프패드 프리즘을 사용하여 수행하였다.

[0654] 도 26에 나타난 바와 같이, 단일 작용제 항-CCR8 처리는 마우스 4T1 종양 모델에서 부분적인 항종양 활성을 유도한 반면, 항-PD-1 처리 단독은 이러한 모델에서 어떠한 항종양 효능도 나타내지 않았다. 항-PD-1에 의한 종양 성장 억제의 부재에도 불구하고, 이러한 Ab와 항-CCR8 Ab의 조합물은 항CCR8에 의해 관찰된 항종양 활성의 대규모 증진에 의해 입증된 강한 상승작용적 상호작용을 생성하였으며, 10마리 마우스 중 7마리가 억제되지 않은 성장을 나타내는 종양에 대한 약 $1,500\text{ mm}^3$ 의 평균 부피와 비교하여, 20 mm^3 미만의 종양 부피를 가졌다. MB49 데이터 (실시예 27)와 함께, 이는 항-PD-1-저항성 종양 모델에서 항-CCR8 치료가 항-PD-1 치료와 조합되었을 때 상승작용적 항종양 효과를 유도할 수 있다는 것을 입증한다.

[0655] 실시예 29

[0656] 항-CCR8 mAb는 SA1N 섬유육종 마우스 모델에서 종양 성장을 감소시킨다

[0657] 항-CCR8-mIgG2a의 항종양 활성을 측정하고, SA1N 섬유육종 마우스 모델에서 Fc-불활성 mIgG1-D265A 중쇄를 갖는 변이체인 CCR8-mIgG1-D265A의 것과 비교하였다. 암컷 A/J 마우스에 각각 10^6 개 SA1N 종양 세포를 SC 주사하고, 종양 이식 5일 후에 군당 9마리 마우스의 처리군으로 무작위화하였다. Ab (항-CCR8-mIgG2a, 항-CCR8-mIgG1-D265A 또는 대조군 mIgG2a Ab)를 이식 후 제5일, 제8일 및 제12일에 IP 주사를 통해 $200\text{ }\mu\text{l}$ 의 부피로 $200\text{ }\mu\text{g}$ /마우스로 투여하였다. 종양 측정을 이식후 57일까지 1주에 2회 기록하고, 그 후 마우스를 안락사시켰다. 데이터 분석 및 그래프화를 그래프패드 프리즘을 사용하여 수행하였다.

[0658] 종양-침윤 림프구의 분석을 위해, 마우스 종양을 이식 16일 후에 수거하였다. 종양을 기계적으로 해리시키고, 멸균 $100\text{-}\mu\text{M}$ 스트레이너를 통해 여과하였다. 샘플을 FcR 차단 시약으로 Fc 수용체에 대해 차단한 후, 림프구 집단에 대해 표면 염색, 고정, 투과화 및 Foxp3에 대해 세포내 염색하였다. 이어서, 세포를 세척하고, 유동 세포측정기를 통해 처리하였다. 플로우조 소프트웨어를 사용하여 분석을 수행하고, 그래프패드 프리즘을 사용하여 그래프화하였다.

[0659] 데이터는 항-CCR8-mIgG2a가 이식후 제25일까지 종양 성장의 속도를 강력하게 감소시켰으며, 9마리의 마우스 중 9마리가 무종양이었던 반면, 대조군 mIgG2a mAb로의 처리는 종양 성장을 억제하지 않았음을 나타낸다 (도 27A). 대조군-처리된 마우스에 대한 측정은 종양 이식 약 57일 후에 중단하였고, 그 후에 나머지 마우스를 안락사시켰다. 이러한 데이터는 항-CCR8 Ab가 이러한 SA1N 마우스 모델에서 종양 성장을 억제하는 데 고도로 효과적이라는 것을 나타낸다. 흥미롭게도, 마우스를 비-고갈 항-CCR8 mAb (CCR8-mIgG1-D265A)로 처리하면 종양 성장이 부분적으로 억제되었고 (도 27A), 이는 적어도 SA1N 종양 모델에서 CCL1에 의한 CCR8 결속이 종양 환경에서 Treg에 의한 면역 억제를 증진시킬 수 있음을 나타낸다.

[0660] 도 27B는 다양한 Ab 처리 후의 Treg인 종양-연관 $CD4^+$ T 세포의 백분율을 나타낸다. 비-고갈 항-CCR8-mIgG1-D265A 처리로 관찰된 항종양 활성에도 불구하고, 고갈 항-CCR8-mIgG2a 처리만이 종양 Treg 고갈을 초래하였다. Treg 억제의 CCL1-매개 증진의 차단은 증가된 염증유발 및 항종양 반응을 유발할 수 있다.

- [0661] 실시예 30
- [0662] 항종양 효능은 항-CCR8의 Fc-결속 이소형을 필요로 한다
- [0663] 항종양 면역에서 Ab-매개 Treg 세포 고갈에 대한 CCR8 차단에 상대적 기여를 추가로 조사하기 위해, 항-mCCR8 Ab (바이오레전드로부터의 클론 SA214G2)를 Fc-결속 (항-CCR8-mIgG2a) 및 비-Fc-결속 또는 불활성 (항-CCR8-mIgG1-D265A) 이소형으로 조작하고, MC38 종양-보유 마우스를 항-CCR8-mIgG2a 또는 항-CCR8-mIgG1-D265A로 처리하였다. mIgG2a 이소형은 Fc 수용체에 강하게 결합하여 ADCC 및 ADCP를 촉진하는 반면, mIgG1-D265A 버전은 그렇지 않다 (Baudino et al., 2008; Nimmerjahn et al., 2010). 항-CCR8-mIgG2a로의 처리는 유의한 종양 퇴행을 유도한 반면 (도 28A 및 D), 항-CCR8-mIgG1-D265A 처리는 IgG2a 이소형 대조군으로의 처리 (도 28A 및 B)와 비교하여 이 MC38 모델에서 종양 성장에 대한 식별가능한 효과를 갖지 않았다 (도 28A 및 C). 중요하게는, 종양에서의 Treg의 빈도는 항-CCR8-mIgG2a로의 처리 후에 75%만큼 감소된 반면, 항-CCR8-mIgG1-D265A 처리는 종양 Treg의 빈도의 하락을 유발하지 않았다 (도 28E). 이는 mAb 4A19가 종양 Treg의 고갈을 매개한 반면, 불활성 백본을 갖는 항-CCR8 Ab (항-CCR8-불활성)는 Treg를 고갈시키지 않았음을 보여주는 시험관내 실험의 결과를 반영하며, 이는 nf 백본을 통한 표적-매개 FcγR 공동결속이 Treg 고갈에 필요함을 시사한다 (실시예 22). 이는 또한 SA1N 종양 모델에서 관찰된 결과와 유사하며, 여기서 항-CCR8-mIgG1-D265A로의 처리는 종양 성장의 부분적 억제에 유발하였지만 (실시예 29), 면역억제 종양 Treg는 고갈되지 않았다 (도 27B).
- [0664] 실제로, 유사한 결합 특징에도 불구하고, 항-CCR8-mIgG2a는 CCR8-발현 표적 세포의 존재하에 FcγRIV를 효과적으로 가교시켰지만, CCR8-mIgG1-D265A 이소형은 그렇지 않았다 (데이터는 나타내지 않음; 문헌 [Campbell et al., 2021] 참조). 항-CCR8-mIgG2a 및 항-CCR8-mIgG1-D265A Ab 둘 다가 CCL1 결합을 유사한 정도로 차단하였음이 또한 입증되었다 (데이터는 제시되지 않음; 문헌 [Campbell et al., 2021] 참조).
- [0665] CCR8 차단은 일반적으로 항종양 활성화에 요구되지는 않지만, 특정의 고도로 면역원성인 종양, 예컨대 SA1N에서, CCL1 결합의 차단은 염증유발 시토카인의 증가로 인해 종양 성장의 부분적 억제를 유발할 수 있는 것으로 결론 지을 수 있다. 보다 큰 종양 퇴행은 Fc-결속 항-CCR8 Ab를 필요로 하는 면역억제성 종양 Treg의 고갈에 의해 생성된다.
- [0666] 종양으로의 FOXP3⁺ Treg 이동은 CCR8-비의존성이다
- [0667] 직교 접근법으로서, 혼합된 골수 키메라를 유사유전자형 Ccr8^{+/+} 및 Ccr8^{-/-} 공여자 골수로 수행하여 CCR8이 Treg의 발생 종양으로의 화학주성 이동을 촉진하는지 여부를 결정하였다.
- [0668] 골수 키메라
- [0669] 암컷 수용자 마우스 (WT-CD45.2-Thy1.1; 잭슨 래보러토리)에게 3시간 간격을 두고 2회 선량의 4.5 Gy를 제공한 후, 유사유전자형 CCR8^{+/+} (WT-CD45.1-Thy1.2; 잭슨 래보러토리) 및 CCR8^{-/-} (CCR8KO/B6N-CD45.2; 잭슨 래보러토리) 골수를 정맥내 전달하였다. 마우스를 항생제 물 상에서 유지하고, 8주 동안 모니터링하고, 이식 8주 후에 채혈하여 공여자 세포 재구성을 평가하였다. 이어서, 10⁶개 MC38 세포를 SC 이식하였다. 종양, 전혈, 림프절 및 비장세포를 면역-모니터링을 위해 12일 후에 수거하였다.
- [0670] 8-주 재구성 단계 후, 증가의 공여자 면역 세포 재구성이 혈액에서 관찰되었다 (데이터는 제시되지 않음). 이어서, 수용자 마우스에게 MC38 종양을 피하로 이식하였다. CCR8-결핍 FOXP3⁺ 세포는 그의 야생형 대응물과 유사하게 종양에 축적되었으며 (도 28F), 이는 종양으로의 FOXP3⁺ Treg 이동이 CCR8-비의존성을 확인시켜 준다.
- [0671] 실시예 31
- [0672] 항-CCR8-매개 Treg 고갈은 종양-특이적 CD8⁺ T 세포의 기억 잠재력을 증진시킨다
- [0673] 종양 항원, AH1을 인식하는 수명이 긴 기억 CD8⁺ T 세포의 생성에 대한 Treg 고갈의 효과 (Huang et al., 1996)를 측정하였다.
- [0674] BALB/c 마우스에게 10⁶개 CT26 종양 세포를 피하 주사하고, 종양이 100-120 mm³의 부피에 도달하였을 때 무작위화하였다. 마우스를 병기결정 후 제1일, 제4일 및 제8일에 용량당 200 μg의 항-CCR8-mIgG2a 및 항-mCTLA-4-IgG2a 처리 Ab 또는 IgG2a 이소형 대조군으로 안와후방 처리하였다. 종양을 제9일에 수거하고, 제11일에 외과

적으로 절제하였다. 3개월 후, 마우스를 채혈하여 AH-1 특이적 $CD8^{+}$ T 세포를 정량화하였다. 마우스를 AH-1 펩티드를 발현하는 10^7 CFU 재조합 리스테리아 모노시토게네스(*Listeria monocytogenes*) (LM-AH1A5)로 정맥내로 켈린지하였다. 리스테리아를 멸균 뇌 심장 주입 브로쓰, 변형물 (테크노바 인크.(Teknova Inc.), 캘리포니아주 홀리스트)에서 밤새 배양하여 10^9 CFU/ml의 정지기 배양물을 달성한 다음, 면역화를 위해 헵크 평형 염 용액(HBSS)으로 10^8 CFU/ml로 희석하였다. 켈린지 5일 후, 비장 및 혈액을 수거하고, 유동 세포측정법으로 처리하였다.

[0675] 예상된 바와 같이, 항-mCTLA4-IgG2a 및 항-CCR8-mIgG2a는 대조군 (도 29C)과 비교하여 강력한 항종양 반응 (도 29A 및 B) 및 Treg 고갈 (도 29D)을 유도하였다. 마지막 처리 1일 후에, 절제된 종양으로부터의 AH-1 사랑체⁺ 세포의 빈도는 대조군 처리된 마우스에 비해 항-mCTLA-4-IgG2a 또는 항-CCR8-mIgG2a로 처리된 마우스에서 더 높은 경향이 있었고 (도 29E), AH-1 사랑체⁺ 세포는 절제 3개월 후에 혈액 및 비장에서 상승된 채로 유지되었다 (도 29F). AH-1 특이적 기억 회상 반응을 평가하기 위해 AH-1을 발현하는 리스테리아 모노시토게네스 균주로 켈린지 시, 항-mCTLA-4-IgG2a 또는 항-CCR8-mIgG2a로 초기에 처리된 마우스는 대조군 마우스와 비교하여 AH-1 사랑체⁺ 이펙터 기억 세포의 보다 큰 회상 확장을 탑재하였다 (도 29G).

[0676] 항-CCR8 처리된 마우스는 또한 AH1A5 펩티드 자극 후 비장에서 유의하게 더 큰 규모의 $IFN\gamma^{+}$ 및 다기능성 $IFN\gamma^{+}TNF\alpha^{+}CD8^{+}$ T 세포를 가졌으며 (도 29H 및 29I), 이는 종양-보유 마우스를 항-CCR8-mIgG2a로 처리하는 것이 이펙터 기능이 높아진 종양 항원-특이적 $CD8^{+}$ T 세포의 빈도를 상승시킴을 입증한다.

[0677] 실시예 32

[0678] 종양 세포 상에서의 CCR8의 차등 발현

[0679] CCR8 및 CD8A에 대한 유전자 발현 데이터를 사용하여 항-CCR8 Ab로의 치료로부터 이익을 얻을 종양 유형을 우선 순위화하였다. 방광 요로상피 암종 (BLCA), 유방 침습성 암종 (BRCA), 자궁경부 편평 세포 암종 및 자궁경내막 선암종 (CESC), 결장 선암종 (COAD), 식도 암종 (ESCA), 다형성 교모세포종 (GBM), 두경부 편평 세포 암종 (HNSC), 신장 헴색소성 (KICH), 신장 투명 신세포 암종 (KIRC), 신장 유두상 신세포 암종 (KIRP), 급성 골수성 백혈병 (LAML), 뇌 저등급 신경교종 (LGG), 간 간세포성 암종 (LIHC), 폐 선암종 (LUAD), 폐 편평 세포 암종 (LUSC), 중피종 (MESO), 난소 장액성 낭선암종 (OV), 췌장 선암종 (PAAD), 크롬친화세포종 및 부신경절종 (PCPG), 전립선 선암종 (PRAD), 직장 선암종 (READ), 육종 (SARC), 피부 흑색종 (SKCM), 위 선암종 (STAD), THCA, UCEC 및 UVM으로부터의 RNA-seq 유전자 발현 데이터를 <https://www.cancer.gov/tcga>에서 액세스된 TCGA 리서치 네트워크(TCGA Research Network)에 의해 생성된 데이터로부터 분석하였다. 유효 치료를 생성하기 위한 치료상 적용가능한 연구 (TARGET, <https://ocg.cancer.gov/programs/target>) 이니셔티브, <https://portal.gdc.cancer.gov/projects>에서 이용가능한 데이터 및 M2GEN 종양학 연구 정보 교환 네트워크 (ORIEN) <https://www.oriencancer.org/> 데이터세트를 사용하여 혈액 종양을 조사하였다.

[0680] CCR8 및 CD8A로부터의 TMM 정규화된 log2 변환된 CPM 값 및 CCR8/CD8A의 비를 종양 유형에 걸쳐 비교하였다. HNSC, LUAD, STAD, LUSC, PAAD, READ, ESCA, BRCA, COAD, CESC, 여포성 림프종 급성 림프구성 백혈병 및 림프종은 조사된 종양 유형에 걸쳐 CCR8의 최고 상대 발현을 갖는 것으로 밝혀졌다. KIRC, LUAD, LUSC, SKCM, STAD, CESC, MESO, HNSC, PAAD 및 BRCA는 종양 유형에 걸쳐 CD8A의 최고 상대 발현을 나타낸다. CD8A/CCR8의 비를 사용하여 CCR8 발현을 또한 갖는 CD8A 양성 종양을 풍부화하였다. HNSC, STAD, LUAD BRCA, LUSC, PAAD, LAML, CESC, SKCM 및 MESO는 분석된 종양 유형에 걸쳐 CD8A/CCR8의 최고 상대 발현을 나타낸다.

[0681] CCR8 및 CD8A의 비교적 높은 발현, 및 그의 높은 CCR8/CD8A 비는 HNSC, LUAD, STAD, LUSC, PAAD, READ, ESCA, BRCA, COAD, CESC, 여포성 림프종, 급성 림프구성 백혈병 및 림프종을 항-CCR8 Ab를 사용한 치료에 특히 적용가능한 것으로 예상되는 종양 유형으로서 확인시켜 준다.

[0682] 실시예 33

[0683] 다수의 인간 암에서의 CCR8 발현

[0684] 보다 높은 수준의 CCR8 발현을 갖는 종양 유형이 CCR8 mAb 요법에 반응할 가능성이 가장 크다는 근본적인 가설과 함께, 적응증 선택을 뒷받침하기 위해 다수의 암 유형에 걸쳐 CCR8 발현을 프로파일링하기 위해, 2 세트의

샘플 (TR-TP 및 MTB 세트)로부터의 17종의 암 유형 또는 하위유형에서 면역조직화학 (IHC)을 수행하였다.

- [0685] TR-TP 샘플 세트는 결장직장 선암종 (CRC), 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC), 비소세포 폐 선암종 (NSCLC-AD), 비소세포 폐 편평 세포 암종 (NSCLC-SQC), 췌장 암종 및 소세포 폐 암종 (SCLC)을 포함한 6종의 종양 유형/하위 유형의 전체-크기 포르말린-고정, 파라핀-포매 (FFPE) 슬라이드를 포함하였으며, 종양 유형당 14-24개의 샘플이 연구되었다. FFPE 조직 샘플을 다양한 상업적 조직 판매업체로부터 입수하였다.
- [0686] 또한, 방광암, 유방암, 자궁경부암, CRC, 자궁내막암, 위암, GBM, HNSCC, 흑색종, NHL, NSCLC-AD, NSCLC-SQC, 난소암, RCC, 전립선암 및 췌장 암종을 포함한 16종의 종양 유형/하위유형을 20건의 사례/종양 유형으로 함유하는 다중-종양 블록 (MTB)을 연구하였다. 각각의 MTB는 FFPE 블록당 단일 적응종의 5건의 사례 및 양성 대조군으로서 1개의 과형성 편도를 함유하였다. MTB는 디스커버리 라이프 사이언스에 의해 주문 제작되었다.
- [0687] CCR8 조직 결합을 검출하기 위해, 자동화 IHC 검정을 개발하고, 상업용 마우스 항-hCCR8 mAb, 클론 433H (비디 바이오사이언시스), 및 레이카 본드 RX 시스템(Leica Bond RX System) (레이카 바이오시스템즈(Leica Biosystems), 일리노이주 버팔로 그로브)으로 검증하였다. 통상의 조직학 절차에 따라 슬라이드를 탈파라핀화하고 재수화시켰다. 습윤 슬라이드를 열 유도 에피토프 회복 (HIER) 및 염색을 위해 레이카 본드 RX 자동화 IHC 염색기 상에 로딩하였다. HIER을 100°C에서 30분 동안 레이카 결합 회복 용액 ER2 (pH 9)로 수행하고, CCR8 IHC 염색을 결합 중합체 정밀화 검출 시스템 (레이카)으로 수행하였다. 간략하게, 퍼옥시다제 차단 (레이카)을 10분 동안 수행한 후, 0.5% 인간 감마 글로불린 (시그마)이 보충된 다코(Dako) 무혈청 단백질 블록 (애질런트(Agilent), 캘리포니아주 산타 클라라)을 사용하여 20분 동안 비-특이적 결합 차단을 수행하였다. 433H 1차 Ab를 60분 동안 0.25 µg/ml로 인큐베이션한 후, 토끼 항-마우스 링커에 이어 항-토끼 폴리-HRP-IgG (레이카)를 각각 8분 동안 인큐베이션하였다. 최종적으로, 슬라이드를 DAB 기질-발색원 용액 (레이카)과 10분 동안 반응시켰다. 이어서, 통상의 조직학적 절차에 따라 슬라이드를 헤마톡실린 (레이카)으로 5분 동안 대조염색하고, 탈수시키고, 청정화하고, 커버슬립을 덮었다. 염색된 슬라이드를 레이카 AT 터보 스캐너를 사용하여 스캐닝하고, 전체-슬라이드 영상 분석을 할로(HALO)® 소프트웨어 (인디카 랩스(Indica Labs), 뉴멕시코주 알버커키)를 사용하여 수행하였다. CCR8 발현은 종양 영역 내의 전체 세포 중 양성 세포의 백분율로서 보고되었다. 샘플 중 소수의 하위세트에서, 영상 분석 점수가 공인 병리학자에 의해 간주되는 바와 같이 정확한 결과를 생성하지 않았을 때, 병리학자에 의해 수동 시각적 점수화를 수행하였다.
- [0688] 강한 CCR8 양성 염색은 주로 막 및 세포질 패턴 둘 다를 나타내는 면역 세포의 하위세트에 분포되었다. 종양 세포에서의 약한 내지 중간 정도의 세포질 염색이 또한 소수의 경우에 관찰되었다. TR-TP 전체-크기 조직 절편에서의 CCR8⁺ 세포의 전체-슬라이드 영상 분석이 도 30A에 제시된 반면, MTB 세트에서의 CCR8⁺ 세포의 전체-슬라이드 영상 분석이 도 30B에 제시된다. TR-TP 및 MTB 데이터 세트 둘 다는 평가된 17종의 종양 유형 중에서 CCR8 발현이 HNSCC에서 가장 풍부하고 GBM에서 가장 덜 풍부하다는 것을 나타낸다. 최고에서 최저 CCR8 발현의 순서로, 종양 코호트는 하기와 같이 순위화되었다: HNSCC, 자궁경부암, CRC, NSCLC-SCC, NSCLC-ADC, 췌장암, 위암, 방광암, 유방 암종, 난소암 및 GBM. RCC, 전립선암, 흑색종, 자궁내막암 및 NHL 종양 코호트는 유사한 수준의 CCR8 발현을 나타냈고, 유방암 종양 코호트에서 관찰된 발현보다 낮았다.
- [0689] 높은 CCR8 발현을 갖는 종양이 CCR8 mAb 요법에 반응할 가능성이 더 크다는 가설에 기초하여, 이들 종양 프로파일링 데이터는 HNSCC, 자궁경부암, CRC, NSCLC-SCC, NSCLC-ADC, 췌장암, 위암, 방광암 및 유방암에 대한 적응증 선택의 우선순위를 뒷받침한다.
- [0690] 실시예 34
- [0691] 암 치료에서의 항-CCR8의 1/2상 임상 연구
- [0692] 단독요법으로서 및 항-PD-1 mAb인 니볼루맙과 조합하여 투여된 4A19 항-CCR8 mAb의 1/2상 연구를, 선택 진행성 고형 종양 환자, 즉 NSCLC, SCCHN, CRC, 위/위식도 (GE) 접합부, 및 자궁경부암을 갖는 대상체에서 수행하여, 특히 안전성, 내약성, 및 단일 작용제로서 및 니볼루맙과의 조합 요법으로서 4A19를 투여하는 것의 효능을 예비로 평가하였다.
- [0693] 연구 설계
- [0694] 이 연구는 4개 부분으로 구성된다: 4A19가 용량 증량 (파트 1A) 및 용량 확장 (파트 2A) 하에 단독요법으로서 투여됨, 4A19가 용량 증량 (파트 1B) 및 확장 (파트 2B) 하에 니볼루맙과 조합하여 투여됨.
- [0695] 용량 증량 단계에서, 항-CCR8의 적합한 용량을 확인하기 위해, 잠재적으로 효과적인 용량 미만의 용량으로 4A19

를 제공받은 참가자의 수를 최소화하기 위해 용량 수준당 적어도 1명의 대상체로 이루어진 4A19 단독요법의 최저 2회 용량 수준을 제외하고는, 각각의 용량에 대해 적어도 3명의 대상체에게 4A19의 용량의 범위를 부여한다. 파트 1A에서, 4A19는 2주마다 1회 (Q2W) 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 및 800 mg의 균일 용량으로 대상체에게 정맥내로 (IV) 투여된다. 잠재적으로 효과적인 용량 미만의 용량에 대한 참가자의 노출 및 시토키인 방출의 위험을 최소화하면서 적절한 안전성을 보장할 목적으로 약리학- 및 독성학-기반 접근법을 혼합하여 생성한 전체 데이터를 사용하여 4A19에 대한 Q2W 0.3 mg (4 µg/kg) IV의 인간-최초 (FIH) 출발 균일 용량을 유도하였다.

- [0696] 파트 1B에서, 4A19는 4주마다 1회 (Q4W) 480 mg의 FDA-승인된 균일 용량으로 IV 투여된 니볼루맵과 조합하여 동일한 균일 용량으로 대상체에게 정맥내로 (IV) 투여된다.
- [0697] 용량 확장을 위해, 상이한 종양 유형 및 증량으로부터의 용량 수준을 포함하는 단일-부분 및 무작위화 코호트를 개방하여 코호트당 적어도 20명의 대상체에게 단독요법 및 조합 요법을 부여한다.
- [0698] 모든 대상체는 최대 3가지 연구 기간을 완료한다:
- [0699] (a) 대상체가 적격성 기준을 충족하고 신선한 종양 생검을 제공하는지 확인하기 위해 평가하는 스크리닝 (최대 28일);
- [0700] (b) 치료 (치료 지연에 관계없이 제1 치료로부터 연구 요법의 최대 26 사이클 [104주], 사이클당 28일); 및
- [0701] (c) 안전성 및 생존 추적 (치료 종료 [EOT] 후 최대 2년의 기간)을 포함한 추적. 연구 참여의 최대 지속기간은 약 4년 (최대 28일의 스크리닝, 최대 2년의 치료, 및 최대 2년의 추적)이다.
- [0702] Ab 약물은 진행, 허용되지 않는 독성, 동의 철회, 26 사이클 (104주)의 연구 요법의 완료, 또는 연구 종료 중 어느 것이든 먼저 일어나는 때까지 대상체에게 투여된다.

[0703] 표 10. 서열식별번호 및 아미노산 서열 요약

서열식별 번호	서열의 설명	아미노산 서열
1	인간 CCR8의 아미노산 서열	MDYTLDLSTV TVTDYYYFDI FSSPCDAELI QTNGKLLAV FYCLLFVFSL LGNSLVILVL VVCCKLRST DVYLLNLALS DLLFVFSFPF QTYVLLDQWV FGTVMCKVVS GFYVIGFYSS MFFITLMSVD RYLAVVHAVY ALKVRTIRMG TTLCLAVWLT AIMATIPLLV FYQVASEDGV LQCYSFYNQQ TLKWKIFTNF KMNILGLLIP FTIFMFCYIK ILHQLKRCQN HNKTKAIRLV LIVVIASLLF WVPFNVVLF LSLHSMHILD GCSISQQLTY ATHVTEIISF THCCVNPVIY AFVGEKFKKH LSEIFQKSCS QIFNYLGRQM PRESCEKSSS CQQHSSRSSS VDYIL
2	인간 CCR8 서열의 아미노산 잔기 15-21	YYYPDIF
3	mAb 16B13에서의 V_H 에 대한 아미노산 서열	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFNMNWRQA PGKGLEWISY ISSGSTTIAH ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCVRL KGSFDYWGQG TLTVVSS
4	mAb 14S15에서의 V_H 에 대한 아미노산 서열	EVQLVEFGGG LVQPKGSLKL SCVVSGERFN PYAMNWRQA PGKGLEWLGK IRSKSNYET YYADSVKDRF IISRDDSQKM VYLQMNVT EDTAMYYCVG YSDLYVLDYW QGQTSVTSS
5	mAb 18Y12에서의 V_H 에 대한 아미노산 서열	QVQLQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT DYEMHWVKQT PVHGLEWIGA IDPKTGSTAY NQKFKGKAIM TADKSSSTAY MELRSLTSED SVVYYCTGLR RFVYWGQGP VTVSA
6	mAb 4A19에서의 V_H 에 대한 아미노산 서열	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DSEMHWRQA TGQGLEWMGA IQPETGGTAY NQKFKARVTM TRDTSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARRR RNFVYWGQG LTVVSS
7	mAb 2M18에서의 V_H 에 대한 아미노산 서열	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCVVSGERFN NFMNWRQV PGKGLEWISY ISRGGTINH ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARRR LGVFDYWGQG TLTVVSS
8	mAb 15C17에서의 V_H 에 대한 아미노산 서열	QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYDMNWRQA PGKGLEWISY ISSSNGNKH ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARRR QGVFDIYGQG TLTVVSS
9	mAb 13T20에서의 V_H 에 대한 아미노산 서열	QVQLVESGGG LVKPRGSLRL SCAASGFTFS VAMHWWRQA PGKGLEWVGR IKSKTDGGTT DYATPVKGRF TISRDDSKNT LYLQMHSLKT EDTAVYYCTV VTMVRGVLYD FWGQGLTVTV SS
10	mAb 10R3에서의 V_H 에 대한 아미노산 서열	QVQLVESGGG VVQPGSLRL SCAASGFTFS SYAMHWWRQA PGKGLEWVGI ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRDED TALYSCARPV NWRGAFDIYG QGTMVTSS
11	mAb 8D55에서의 V_H 에 대한 아미노산 서열	QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYNMIWVRQT PGKGLEWISY ISSRSIIISY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARRW KGVFDYWGQG TLTVVSS
12	mAb 1V11에서의 V_H 에	QVQLVESGGG VVQPGSLRL SCAASGFTFS

[0704]

서열식별 번호	서열의 설명	아미노산 서열
	대한 아미노산 서열	NYAMHWVRQA PGKGLDWLAV ISYDGSNKYH SDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQINSLRAED AAVYYCARRG ELGIGGFDYW GQGTLLTVSS
13	mAb 11K16에서의 V_H 에 대한 아미노산 서열	QVQLVESGGG LVLPGGSLRL SCAASGFTFS SNNMIWVRQA PGKGLEWVSF ISSSSSTISY ADSVRGRFTI SRDNAKNSLF LQMNSLRDED TAVYYCARRW RGVFDYWQQG TLTVSS
14	mAb 12F27에서의 V_H 에 대한 아미노산 서열	QVQLVESGGG VVQPGSLRL SCAASGFSFR SYGIHWVRQA PGKGLEWVAV ISYEGSNKRY ADSVKGRFTI SRDNSKSTLS LQMNSLRAED TAVYYCAKGR RPSGEGAFDI WQGTMTMTVS S
15	mAb 16B13에서의 V_L 에 대한 아미노산 서열	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYG ASRLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGQ GTKVEIK
16	mAb 14S15에서의 V_L 에 대한 아미노산 서열	DIVMTQAAPS VPVTPGESVS ISCRSSKSLL HSNGNTFLYW FLQRPQQSPQ LLIYRMSNLA SGVPHRFSGS GSGTAFTLRI SRVEADVGV YYCMQHLEYP FTFGSGTKLE IK
17	mAb 18Y12에서의 V_L 에 대한 아미노산 서열	DVVMQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSRQSLV HSSGYTYLHW YLQKPGQSPK LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEADLGV YFCSQSTHVP FTFGSGTKLE IK
18	mAb 4A19에서의 V_L 에 대한 아미노산 서열	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSLE HSSGNTYTLHW YLQKPGQPPQ LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEADVGV YYCSQSTHVP FTFGSGTKLE IK
19	mAb 2M18에서의 V_L 에 대한 아미노산 서열	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGQ GTKVEIK
20	mAb 15C17에서의 V_L 에 대한 아미노산 서열	DIVMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQGIS RWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK
21	mAb 13T20에서의 V_L 에 대한 아미노산 서열	DIVMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSTRTFGG GTKVEIK
22	mAb 10R3에서의 V_L 에 대한 아미노산 서열	EIVLTQSPDF QSVTPKEKVT ITCRASQSIG SHLHWYQQKP DQSPKLLIKY ASQSFGVPS RFGSGSGTD FSLTINSLET EDAATYFCHQ SYSPLPTFGG GTKVEIK
23	mAb 8D55에서의 V_L 에 대한 아미노산 서열	DIVMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGQ GTKVEIK
24	mAb 1V11에서의 V_L 에 대한 아미노산 서열	DIVMTQTPLS SPVTLGRPAS ISCRSSRSLV HTDGNTYLNW LQQRPGQPPR LLIYKISNRF SGVPDRFSGS GAGTDFTLKI TRVEADVGV YYCMQATQFP LTFGPGTKVD IK
25	mAb 11K16에서의 V_L 에 대한 아미노산 서열	DIVMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGQ GTKVEIK
26	mAb 12F27에서의 V_L 에	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQGIS

[0705]

서열식별 번호	서열의 설명	아미노산 서열
	대한 아미노산 서열	SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSFPPTFGQ GTKVEIK
27	mAb 16B13에서의 V_H CDR1에 대한 아미노산 서열	GFTFSSFNMN
28	mAb 16B13에서의 V_H CDR2에 대한 아미노산 서열	YISSGSTTIA HADSVKG
29	mAb 16B13에서의 V_H CDR3에 대한 아미노산 서열	RLKGSFDY
30	mAb 16B13에서의 V_L CDR1에 대한 아미노산 서열	RASQGISSWL A
31	mAb 16B13에서의 V_L CDR2에 대한 아미노산 서열	GASRLQS
32	mAb 16B13에서의 V_L CDR3에 대한 아미노산 서열	QQYNSYPPT
33	mAb 14S15에서의 V_H CDR1에 대한 아미노산 서열	GFRFNPYAMN
34	mAb 14S15에서의 V_H CDR2에 대한 아미노산 서열	RIRSKSNNYE TYYADSVKD
35	mAb 14S15에서의 V_H CDR3에 대한 아미노산 서열	YSDLYVLDY
36	mAb 14S15에서의 V_L CDR1에 대한 아미노산 서열	RSSKSLLSN GNTFLY
37	mAb 14S15에서의 V_L CDR2에 대한 아미노산 서열	RMSNLAS
38	mAb 14S15에서의 V_L CDR3에 대한 아미노산 서열	MQHLEYPPT
39	mAb 18Y12에서의 V_H CDR1에 대한 아미노산 서열	GYTFDYEEMH

[0706]

서열식별 번호	서열의 설명	아미노산 서열
40	mAb 18Y12에서의 V_H CDR2에 대한 아미노산 서열	AIDPKTGSTA YNQKFKG
41	mAb 18Y12에서의 V_H CDR3에 대한 아미노산 서열	LRRFVY
42	mAb 18Y12에서의 V_L CDR1에 대한 아미노산 서열	RSSKSLHNSN GNTFLY
43	mAb 18Y12에서의 V_L CDR2에 대한 아미노산 서열	RVSNRFS
44	mAb 18Y12에서의 V_L CDR3에 대한 아미노산 서열	SQSTHVPFT
45	mAb 4A19에서의 V_H CDR1에 대한 아미노산 서열	GYTFDSEMH
46	mAb 4A19에서의 V_H CDR2에 대한 아미노산 서열	AIQPETGGTA YNQKFKA
47	mAb 4A19에서의 V_H CDR3에 대한 아미노산 서열	RRRNFDY
48	mAb 4A19에서의 V_L CDR1에 대한 아미노산 서열	RSSQSLFHSS GNTYLH
49	mAb 4A19에서의 V_L CDR2에 대한 아미노산 서열	KVSNRFS
50	mAb 4A19에서의 V_L CDR3에 대한 아미노산 서열	SQSTHVPFT
51	mAb 2M18에서의 V_H CDR1에 대한 아미노산 서열	GFTFSNFNMI
52	mAb 2M18에서의 V_H CDR2에 대한 아미노산 서열	HISRGGTTIN HADSVKG
53	mAb 2M18에서의 V_H CDR3에 대한 아미노산	RLGVFDY

[0707]

서열식별 번호	서열의 설명	아미노산 서열
	서열	
54	mAb 2M18에서의 V_L CDR1에 대한 아미노산 서열	RASQGISSWL A
55	mAb 2M18에서의 V_L CDR2에 대한 아미노산 서열	AASSLQS
56	mAb 2M18에서의 V_L CDR3에 대한 아미노산 서열	QQYNSYPPT
57	mAb 15C17에서의 V_H CDR1에 대한 아미노산 서열	GFTFSSYDMN
58	mAb 15C17에서의 V_H CDR2에 대한 아미노산 서열	YISSNGNKH HADSVKG
59	mAb 15C17에서의 V_H CDR3에 대한 아미노산 서열	RQGVFDI
60	mAb 15C17에서의 V_L CDR1에 대한 아미노산 서열	RASQGISRWL A
61	mAb 15C17에서의 V_L CDR2에 대한 아미노산 서열	AASSLQS
62	mAb 15C17에서의 V_L CDR3에 대한 아미노산 서열	QQYNSYPPT
63	mAb 13T20에서의 V_H CDR1에 대한 아미노산 서열	GFTFSVAMMH
64	mAb 13T20에서의 V_H CDR2에 대한 아미노산 서열	RIKSKTDGGT TDYATPVKG
65	mAb 13T20에서의 V_H CDR3에 대한 아미노산 서열	VTMVRGVLYD F
66	mAb 13T20에서의 V_L CDR1에 대한 아미노산 서열	RASQSVSSNY LA
67	mAb 13T20에서의 V_L	GASSRAT

[0708]

서열식별 번호	서열의 설명	아미노산 서열
	CDR2에 대한 아미노산 서열	
68	mAb 13T20에서의 V_L CDR3에 대한 아미노산 서열	QQYGSSRT
69	mAb 10R3에서의 V_H CDR1에 대한 아미노산 서열	GFTFSSYAMH
70	mAb 10R3에서의 V_H CDR2에 대한 아미노산 서열	IISYDGSNKY YADSVKG
71	mAb 10R3에서의 V_H CDR3에 대한 아미노산 서열	VPNWRGAFDI
72	mAb 10R3에서의 V_L CDR1에 대한 아미노산 서열	RASQSIGSHL H
73	mAb 10R3에서의 V_L CDR2에 대한 아미노산 서열	YASQSFS
74	mAb 10R3에서의 V_L CDR3에 대한 아미노산 서열	HQSYSPLT
75	mAb 8D55에서의 V_H CDR1에 대한 아미노산 서열	GFTFSNYNMI
76	mAb 8D55에서의 V_H CDR2에 대한 아미노산 서열	YISSRSIIS YADSVKG
77	mAb 8D55에서의 V_H CDR3에 대한 아미노산 서열	RWKGVFYD
78	mAb 8D55에서의 V_L CDR1에 대한 아미노산 서열	RASQGSSWL A
79	mAb 8D55에서의 V_L CDR2에 대한 아미노산 서열	AASSLQS
80	mAb 8D55에서의 V_L CDR3에 대한 아미노산 서열	QQYNSYPPT

[0709]

서열식별 번호	서열의 설명	아미노산 서열
81	mAb 1V11에서의 V_H CDR1에 대한 아미노산 서열	GFTFSNYAMH
82	mAb 1V11에서의 V_H CDR2에 대한 아미노산 서열	YDGSNKYHSD SVKG
83	mAb 1V11에서의 V_H CDR3에 대한 아미노산 서열	RGELGIGGFD Y
84	mAb 1V11에서의 V_L CDR1에 대한 아미노산 서열	RSSRSLVHTD GNTYLN
85	mAb 1V11에서의 V_L CDR2에 대한 아미노산 서열	KISNRFS
86	mAb 1V11에서의 V_L CDR3에 대한 아미노산 서열	MQATQFPILT
87	mAb 11K16에서의 V_H CDR1에 대한 아미노산 서열	GFTFSSNNMI
88	mAb 11K16에서의 V_H CDR2에 대한 아미노산 서열	YISSSSTIS YADSVRG
89	mAb 11K16에서의 V_H CDR3에 대한 아미노산 서열	RWRGVFDY
90	mAb 11K16에서의 V_L CDR1에 대한 아미노산 서열	RASQGISSWL A
91	mAb 11K16에서의 V_L CDR2에 대한 아미노산 서열	AASSLQS
92	mAb 11K16에서의 V_L CDR3에 대한 아미노산 서열	QQYNSYPPT
93	mAb 12F27에서의 V_H CDR1에 대한 아미노산 서열	GFSFRSYGIH
94	mAb 12F27에서의 V_H CDR2에 대한 아미노산	VISYEGSNKR YADSVKG

[0710]

서열식별 번호	서열의 설명	아미노산 서열
	서열	
95	mAb 12F27에서의 V_H CDR3에 대한 아미노산 서열	GRRPSGEGAF DI
96	mAb 12F27에서의 V_L CDR1에 대한 아미노산 서열	RASQGISSWL A
97	mAb 12F27에서의 V_L CDR2에 대한 아미노산 서열	AASSLQS
98	mAb 12F27에서의 V_L CDR3에 대한 아미노산 서열	QQYNSFPPT
99	mAb 16B13의 중쇄에 대한 아미노산 서열	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFNMNWVRQA PGKGLEWISY ISSGSTTIAH ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCVRRRL KGSFDYWQQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPSS SSGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLIH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQFPENN YKTTTPPVLDG DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMH EALHNHYTQKS LSLSPGK
100	mAb 14S15의 중쇄에 대한 아미노산 서열	EVQLVEFGGG LVQPKGSLKL SCVVSGRFRN PYAMNWVRQA PGKGLEWLGR IRSKSNNYET YYADSVKDRF IISRDDSQKM VYLQMNNVKT EDTAMYYCVG YSDLYVLDYW GQGTSTVTSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVPE KSCDKHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
101	mAb 18Y12의 중쇄에 대한 아미노산 서열	QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT DYEMHWVKQT PVHGLEWIGA IDPKTGSTAY NQKFKGKAIM TADKSSSTAY MELRSLTSED SVVYYCTGLR RFVYWGQGP VTSVAASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KRVEPKSCDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE

[0711]

서열식별 번호	서열의 설명	아미노산 서열
		VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL LSPGK
102	mAb 4A19의 중쇄에 대한 아미노산 서열	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DSEMHWVRQA TGGGLEWMGA IQPETGGTAY NQKFKARVTM TRDTSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARRR RNFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VSVLTVLHQ DWLNKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPG
103	mAb 14S15h에서의 V _H CDR1에 대한 아미노산 서열	GFRFGPYAMN
104	mAb 14S15h에서의 V _H CDR2에 대한 아미노산 서열	RIRSKSNYE TYYADSVKD
105	mAb 14S15h에서의 V _H CDR3에 대한 아미노산 서열	YSDLVLDY
106	mAb 14S15h에서의 V _L CDR1에 대한 아미노산 서열	RSSKSLLSQ GNTFLY
107	mAb 14S15h에서의 V _L CDR2에 대한 아미노산 서열	RMSNLAS
108	mAb 14S15h에서의 V _L CDR3에 대한 아미노산 서열	MQHLEYPFT
109	인간 CCR8 서열의 아미노산 잔기 12-22	VTDYYPDIFS
110	mAb 12F27의 중쇄에 대한 아미노산 서열	QVQLVESGGG VVQPGSLRL SCAASGFSTR SYGIHWVRQA PGKGLEWVAV ISYEGSNKRY ADSVKGRFTI SRDNSKSTLS LQMNSLRAED TAVYYCAKGR RPSGEGAFDI WGQGTMTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKCDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV

[0712]

서열식별 번호	서열의 설명	아미노산 서열
		SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K
111	mAb 16B13의 경쇄에 대한 아미노산 서열	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQGIS SWLAWYQQKPK EKAPKSLIYG ASRLQSGVPS RFGSGSGSTGDT FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPTTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFFP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
112	mAb 14S15의 경쇄에 대한 아미노산 서열	DIVMTQAAPS VPVTPGESVS ISCRSSKSL HSNGNTFLYW FLQRPQGSPQ LLIYRMSNLA SGVPHRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP FTFGSGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
113	mAb 18Y12의 경쇄에 대한 아미노산 서열	DVMTQTPLS LPVSLGDAQS ISCRSRQSLV HSSGYTYLHW YLQKPGQSPK LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP FTFGSGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
114	mAb 4A19의 경쇄에 대한 아미노산 서열	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSLF HSSGNTYTLHW YLQKPGQPPQ LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHVP FTFGSGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
115	mAb 14S15h에서의 V _H 에 대한 아미노산 서열	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFRFG PYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKSNYET YYADSVKDRF TISRDDSKNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCVG YSDLYVLDYW GQGTLVTVSS
116	mAb 14S15h에서의 V _L 에 대한 아미노산 서열	DIVMTQTTPS LPVNPGEFAS ISCRSSKSL HSQGNFTFLYW YLQKPGQSPQ LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGSDFTLKI SWVEAEDVGV YYCMQHLEYP FTFGPGTKVD IK
117	mAb 14S15h의 중쇄에 대한 아미노산 서열	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFRFG PYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKSNYET YYADSVKDRF TISRDDSKNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCVG YSDLYVLDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFAPLAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHPKPS NTKVDKRVET KSCDKHTCTP PCPAPELLGG PSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVDVNS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN

[0713]

서열식별 번호	서열의 설명	아미노산 서열
		STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPLEKTIK KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFCSCV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
118	mAb 14S15h의 경쇄에 대한 아미노산 서열	DIVMTQTTPS LPVNPGEFAS ISCRSSKSL HSQGNFTLYW YLQKPGQSPQ LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGSDFTLKI SWVEADVGV YYCMQHLEYP FTFGPGTKVD IKRTVAAPSV FIFFPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKSDTYS SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
119	mAb 12F27의 경쇄에 대한 아미노산 서열	DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCRASQGIS SWLAWYQQKPK EKAPKSLIYA ASSLSQGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSFPTTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFFP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSK STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
120	마우스 CCR8의 아미노산 서열	MDYTMENPVT MTDYYPDFET APCDAEFLLR GSMYLAAILY CVLFLVLGLG NSLVILVLVG CKKLRSITDI YLLNLAASDL LFLVSLPFQT HNLLDQWVFG TAMCKVVSGL YYIGFFSSMF FITLMSVDYR LAIVHAVYAI KVRTASVGT LSLTWVLAAY TATIPLMVFY QVASEDGMQL CFQFYEEQSL RWKLFTHFEI NALGILLPFA ILLFCYVRIL QQLRGCLNHN RTRAIKLVLT VVIVSLFLVW PFNVALFLTS LHDHLILDGC ATRQRLALAI HVTEVISFTH CCVNPVIYAF IGEKFKKHLM DVFQKSCSHI FLYLGRQMPV GALERQLSSN QRSSHSTLD DIL

[0714]

[0715] 참고문헌

- [0716] Abhinandan KR, Martin AC (2008) Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. *Mol Immunol* 45:3832-3839.
- [0717] Akinleye A, Rasool Z (2019) Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J HematolOncol* 12(92).
- [0718] Al-Lazikani, Lesk AM, Chothia C (1997) Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* 273(4):927-48.
- [0719] Alvisi G, Brummelman J, Puccio S, Mazza EMC, Tomada EP, Losurdo A *et al.* (2020) IRF4 instructs effector Treg differentiation and immune suppression in human cancer. *J Clin Invest* 130(6):3137-50.
- [0720] Arce Vargas F, Furness AJS, Solomon I, Joshi K, Mekkaoui L (2017) Fc-optimized anti-CD25 depletes tumor-infiltrating regulatory T cells and synergizes with PD-1 blockade to eradicate established tumors. *Immunity* 46(4):577-86.
- [0721] Baitsch L, Legat A, Barba L, Fuertes Marraco SA, Rivals JP *et al.* (2012) Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. *PLoS One* 7(2): e30852.
- [0722] Barsheshet Y, Wildbaum G, Levy E, Vicenshtein 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.
- [0723] Baudino L, Shinohara Y, Nimmerjahn F, Furukawa J-I, Nakata M, Martinez-Soria E *et al.* (2008) Crucial role of aspartic acid at position 265 in the CH2 domain for murine IgG2a and IgG2b Fc-associated effector functions. *J Immunol* 181(9):6664-9.
- [0724] 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.
- [0725] Brahmer JR, Hammers H, Lipson EJ (2015) Nivolumab: targeting PD-1 to bolster antitumor immunity. *Future Oncol* 11(9):1307-26.

- [0726] 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.
- [0727] Callahan M, Postow MA, Wolchok JD (2016) Targeting T cell co-receptors for cancer therapy. *Immunity* 44(5):1069-78.
- [0728] 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).
- [0729] Chakravarthi BVSK, Nepal S, Varambally S (2016) Genomic and epigenomic alterations in cancer. *Am J Pathol* 186(7): 1724-35.
- [0730] Chothia C, Lesk AM (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196:901-17.
- [0731] Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill JS *et al.* (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342:877-83.
- [0732] Dall'Ozzo S, Tartas S, Piantaud 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.
- [0733] Depis 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.
- [0734] De Simone M, Arrighi A, Rossetti G *et al.* (2016) Transcriptional landscape of human tissue lymphocytes unveils uniqueness of tumor-infiltrating T regulatory cells. *Immunity* 5:1135-47.
- [0735] Drugs.com - Opdivo Approval History: <https://www.drugs.com/history/opdivo.html>, last accessed March 23, 2020.
- [0736] European Patent No. EP 1176195, granted May 22, 2013 to Kyowa Hakko Kirin Co.
- [0737] Farkona *et al.* (2016) Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine* 14:73.
- [0738] 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.
- [0739] Finotello F, Trajanoski Z (2017) New strategies for cancer immunotherapy: targeting regulatory T cells. *Genome Medicine* 9:10.
- [0740] 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.
- [0741] 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.
- [0742] 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>.
- [0743] 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.
- [0744] 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.

- [0745] 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.
- [0746] Han S, Toker A, Liu ZQ, Ohashi PS (2019) Turning the tide against regulatory T cells. *Front Oncol* 9: 279.
- [0747] 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).
- [0748] 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.
- [0749] 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.
- [0750] 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.
- [0751] Hollinger and Hudson (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotech* 23(9):1126-36.
- [0752] 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.
- [0753] 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.
- [0754] 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 RIIla. *Clin Cancer Res* 12(9):2879-87.
- [0755] 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. *J Clin Oncol* 30:837-42.
- [0756] Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT (2018) Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer* 118(1):9-16.
- [0757] 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
- [0758] 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.
- [0759] 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* 116:9999-10008.
- [0760] 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.
- [0761] Kaufman RJ, Sharp PA (1982) Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene. *Mol Biol* 159:601-21.
- [0762] 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.

- [0763] Khattri R, Cox T, Yasayko S-A, Ramsdell F (2003) An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nature Immunol* 4(4):337-42.
- [0764] Korman AJ, Engelhardt J, Loffredo J, Valle J, Akter R *et al.* (2017) Next-generation anti-CTLA-4 antibodies [abstract]. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017; Apr 1-5, 2017; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 77(13 Suppl): Abstract nr SY09-01.
- [0765] 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.
- [0766] 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.
- [0767] 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.
- [0768] 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.
- [0769] 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.
- [0770] 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.
- [0771] 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.
- [0772] Louis E, El Ghoul Z, Vermeire S, Dall'Ozzo S, Rutgeerts P *et al.* (2004) Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 19: 511-9.
- [0773] Ludeman JP, Stone MJ (2014) The structural role of receptor tyrosine sulfation in chemokine recognition. *Br J Pharmacol* 171:1167-79.
- [0774] 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.
- [0775] Martin A, Cheetham JC, Rees AR (1989) Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(23):9268-72.
- [0776] MacCallum RM., Martin ACR, Thornton JT (1996) Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol* 262:732-745.
- [0777] 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.
- [0778] Mehta AY, Heimburg-Molinaro J, Cummings RD, Goth CK (2020) Emerging patterns of tyrosine sulfation and O-glycosylation cross-talk and co-localization. *Curr Opin Struct Biol* 62:102-11.
- [0779] Mellman I, Coukos G, Dranoff (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480: 480-9.
- [0780] Miescher S, Spycher MO, Amstutz H, De Haas M, Kleijer M *et al.* (2004) A single recombinant anti-RhD

IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the FcγRIIA and FcγRIIIA genes. *Blood* 103: 4028-35.

- [0781] Moore KL. (2003) The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation. *J Biol Chem* 278(27):24243-6.
- [0782] Moessner E, Bruenker P, Moser S, Puentener 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.
- [0783] 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.
- [0784] National Cancer Institute (2021). The Cancer Genome Atlas Program. <https://www.cancer.gov/tcga>. Last accessed March 13, 2021.
- [0785] 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.
- [0786] 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.
- [0787] Nimmerjahn F, Lux A, Albert H, Woigk M, Lehmann C, Dudziak D *et al.* (2010) FcγRIV deletion reveals its central role for IgG2a and IgG2b activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(45):19396-401.
- [0788] Nimmerjahn F, Ravetch JV (2005) Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310:1510-2.
- [0789] Olafsen and Wu (2010) Antibody vectors for imaging. *Semin Nucl Med* 40(3):167-81.
- [0790] Pardoll DM (2012) The blockage of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12: 252-64.
- [0791] PCT 공개 번호 WO 2007/044756, 2007년 4월 19일 공개, 이코스 코포레이션(ICOS Corp.)
- [0792] PCT 공개 번호 WO 2008/156712, 2008년 12월 24일 공개, 오가논 엔브이(Organon NV).
- [0793] PCT 공개 번호 WO 2012/145493, 2012년 10월 26일 공개, 암플리문, 인크.(Amplimmune, Inc.)
- [0794] PCT 공개 번호 WO 2013/173223, 2013년 11월 21일 공개, 브리스톨-마이어스 스퀴프 캄파니(Bristol-Myers Squibb Co.)
- [0795] PCT 공개 번호 WO 2014/179664, 2014년 11월 6일 공개, 어냅티스바이오, 인크.(AnaptysBio, Inc.)
- [0796] PCT 공개 번호 WO 2014/194302, 2014년 12월 4일 공개, 소렌토 테라퓨틱스, 인크.(Sorrento Therapeutics, Inc.)
- [0797] PCT 공개 번호 WO 2014/206107, 2014년 12월 31일 공개, 상하이 쉐스 바이오사이언시스 인크.(Shanghai Junshi Biosciences Inc.)
- [0798] PCT 공개 번호 WO 2015/035606, 2015년 3월 19일 공개, 베이진, 리미티드(Beigene, Ltd.)
- [0799] PCT 공개 번호 WO 2015/085847, 2015년 6월 18일 공개, 상하이 헝뤄 파마슈티칼스 캄파니 리미티드(Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd.)
- [0800] PCT 공개 번호 WO 2015/112800, 2015년 7월 30일 공개, 레게네론 파마슈티칼스, 인크.(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)
- [0801] PCT 공개 번호 WO 2015/112900, 2015년 7월 30일 공개, 다나-파버 캔서 인스티튜트, 인크.(Dana-Farber Cancer Institute, Inc.) 및 노파르티스 아게(Novartis AG)
- [0802] PCT 공개 번호 WO 2016/106159, 2016년 6월 30일 공개, 이누머럴 바이오메디컬 홀딩스, 인크.(Enumeral Biomedical Holdings, Inc.)

- [0803] PCT 공개 번호 WO 2016/149201, 2016년 9월 22일 공개, 시툼엑스 테라퓨틱스, 인크.(Cytomx Therapeutics, Inc.)
- [0804] PCT 공개 번호 WO 2016/197367, 2016년 12월 15일 공개, 옥시 바이올로지스 (상하이) 캄파니 리미티드(Wuxi Biologics (Shanghai) Co. Ltd.)
- [0805] PCT 공개 번호 WO 2017/020291, 2017년 2월 9일 공개, 옥시 바이올로지스 (상하이) 캄파니 리미티드
- [0806] PCT 공개 번호 WO 2017/020858, 2017년 2월 9일 공개, 옥시 바이올로지스 (상하이) 캄파니 리미티드
- [0807] PCT 공개 번호 WO 2017/024465, 2017년 2월 16일 공개, 이노벤트 바이올로지스 (쑤저우) 캄파니 리미티드 (Innovent Biologics (Suzhou) Co., Ltd.)
- [0808] PCT 공개 번호 WO 2017/024515, 2017년 2월 16일 공개, 옥시 바이올로지스 (케이만) 인크.(Wuxi Biologics (Cayman) Inc.)
- [0809] PCT 공개 번호 WO 2017/025016, 2017년 2월 16일 공개, 이노벤트 바이올로지스 (쑤저우) 캄파니 리미티드
- [0810] PCT 공개 번호 WO 2017/025051, 2017년 2월 16일 공개, 옥시 바이올로지스 (케이만) 인크.
- [0811] PCT 공개 번호 WO 2017/034916, 2017년 3월 2일 공개, 일라이 릴리 앤드 캄파니(Eli Lilly and Co.)
- [0812] PCT 공개 번호 WO 2017/040790, 2017년 3월 9일 공개, 아제누스 인크.(Agenus Inc.)
- [0813] PCT 공개 번호 WO 2017/106061, 2017년 6월 22일 공개, 마크로제닉스, 인크.(Macrogenics, Inc.)
- [0814] PCT 공개 번호 WO 2017/123557, 2017년 7월 20일 공개, 아르모 바이오사이언시스, 인크.(Armo Biosciences, Inc.)
- [0815] PCT 공개 번호 WO 2017/132827, 2017년 8월 10일 공개, 이노벤트 바이올로지스 (쑤저우) 캄파니 리미티드
- [0816] PCT 공개 번호 WO 2017/133540, 2017년 8월 10일 공개, 이노벤트 바이올로지스 (쑤저우) 캄파니 리미티드
- [0817] PCT 공개 번호 WO 2018/112033, 2018년 6월 21일 공개, 하버드 칼리지(Harvard College)
- [0818] PCT 공개 번호 WO 2019/157098, 2019년 8월 15일 공개, 애드박시스 인크.(Advaxis, Inc.)
- [0819] PCT 공개 번호 WO 2020/138489, 2020년 7월 2일 공개, 시오노기 & 캄파니, 리미티드(Shionogi & Co., Ltd.)
- [0820] Pianko MJ, Liu Y, Bagchi S, Lesokhin AM (2017) Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: a review. *Stem Cell Investig* 4:32.
- [0821] Plitas G, Konopacki C, Wu K *et al.* (2016) Regulatory T cells exhibit distinct features in human breast cancer. *Immunity* 5:1122-34.
- [0822] Saleh R, Elkord E (2020) FoxP3⁺ T regulatory cells in cancer: prognostic biomarkers and therapeutic targets. *Cancer Lett* 490:174-85.
- [0823] Scortegagna M, Hockemeyer K, Dolgalev I, Poznaniak 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.
- [0824] 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.
- [0825] 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.
- [0826] 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.

- [0827] 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.
- [0828] Shitara K, Nishikawa H (2018) Regulatory T cells: a potential target in cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 1417(1):104-15.
- [0829] 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.
- [0830] 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.
- [0831] Tao H, Mimura Y, Aoe K *et al.* (2012) Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer* 75:95-101.
- [0832] 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.
- [0833] 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.
- [0834] 미국 특허 번호 6,808,710, 2004년 10월 26일 허여, 우드(Wood) 등
- [0835] 미국 특허 번호 7,488,802, 2009년 2월 10일 허여, 콜린스(Collins) 등
- [0836] 미국 특허 번호 7,943,743, 2011년 5월 17일 허여, 코르만(Korman) 등
- [0837] 미국 특허 번호 7,767,429, 2010년 8월 3일 허여, 북바인더(Bookbinder) 등
- [0838] 미국 특허 번호 8,008,449, 2011년 8월 30일 허여, 코르만(Korman) 등
- [0839] 미국 특허 번호 8,168,757, 2012년 5월 1일 허여, 핀네프록(Finnefrock) 등
- [0840] 미국 특허 번호 8,217,149, 2012년 7월 10일 허여, 어빙(Irving) 등
- [0841] 미국 특허 번호 8,354,509, 2013년 1월 15일 허여, 카르벤(Carven) 등
- [0842] 미국 특허 번호 8,779,108, 2014년 7월 15일 허여, 퀘바(Queva) 등
- [0843] 미국 특허 번호 9,175,082, 2015년 11월 3일 허여, 저우(Zhou) 등
- [0844] 미국 특허 번호 9,205,148, 2015년 12월 3일 허여, 랭거만(Langermann) 등
- [0845] 미국 특허 번호 9,624,298, 2017년 4월 18일 허여, 나스트리(Nastri) 등
- [0846] 미국 특허 번호 10,087,259, 2018년 10월 2일 허여, 루덴스키(Rudenski) 및 플리타스(Plitas)
- [0847] 미국 특허 번호 10,550,191, 2020년 2월 4일 허여, 요시다(Yoshida) 등
- [0848] 미국 공개 번호 2004/0110704, 2004년 6월 10일에 공개된 야만(Yamane) 등
- [0849] 미국 공개 번호 2015/0079109, 2015년 3월 19일 공개, 리(Li) 등
- [0850] 미국 공개 번호 2016/0272708, 2016년 9월 22일 공개, 첸(Chen) 등
- [0851] 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.
- [0852] Wang C, Thudium KB, Han M, Wang XT *et al.* (2014) *In vitro* characterization of the anti-PD-1 antibody

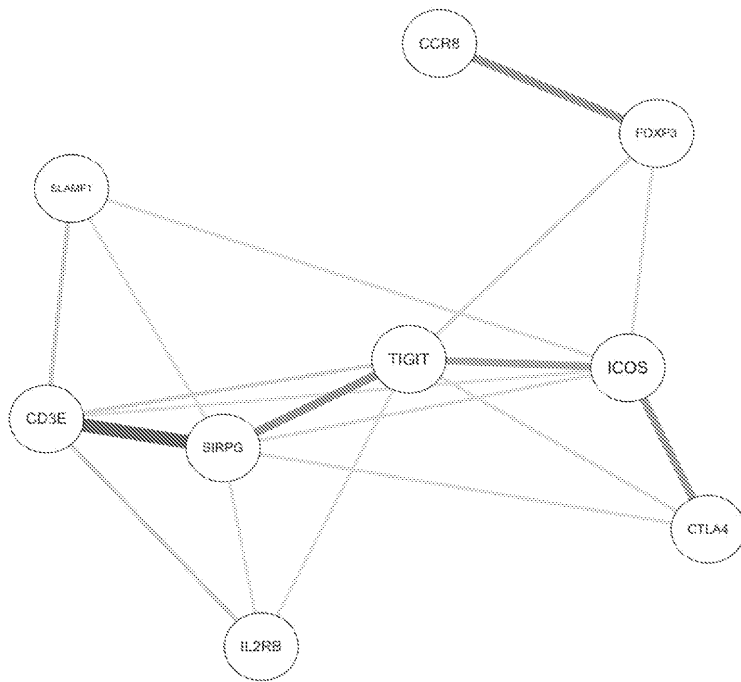
nivolumab, BMS-936558, and *in vivo* toxicology in non-human primates. *Cancer Imm Res* 2(9):846-56.

- [0853] 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.
- [0854] 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.
- [0855] 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>.
- [0856] 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.
- [0857] Wolchok JD, Weber JS, Maio M, Neyns B, Harmanakaya 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.
- [0858] 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.
- [0859] 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.
- [0860] 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.
- [0861] 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.
- [0862] Yao S, Zhu Y, Chen L (2013) Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nature Rev Drug Discov* 12:130-46.
- [0863] 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.
- [0864] 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.
- [0865] 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.
- [0866] 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.
- [0867] 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.

도면

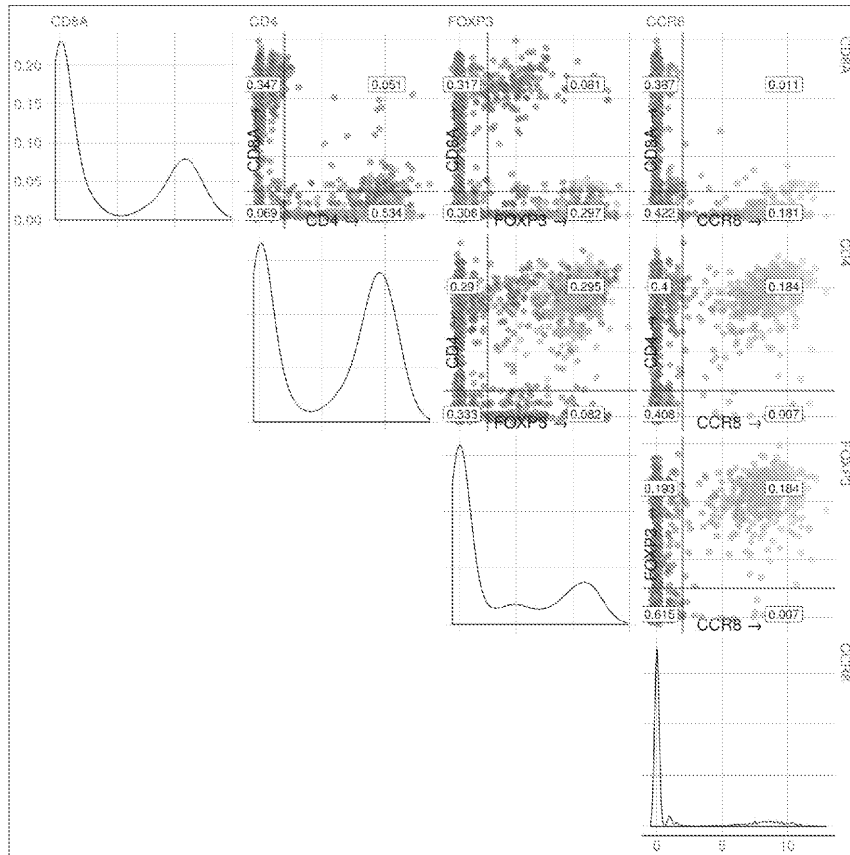
도면1i

도 1A



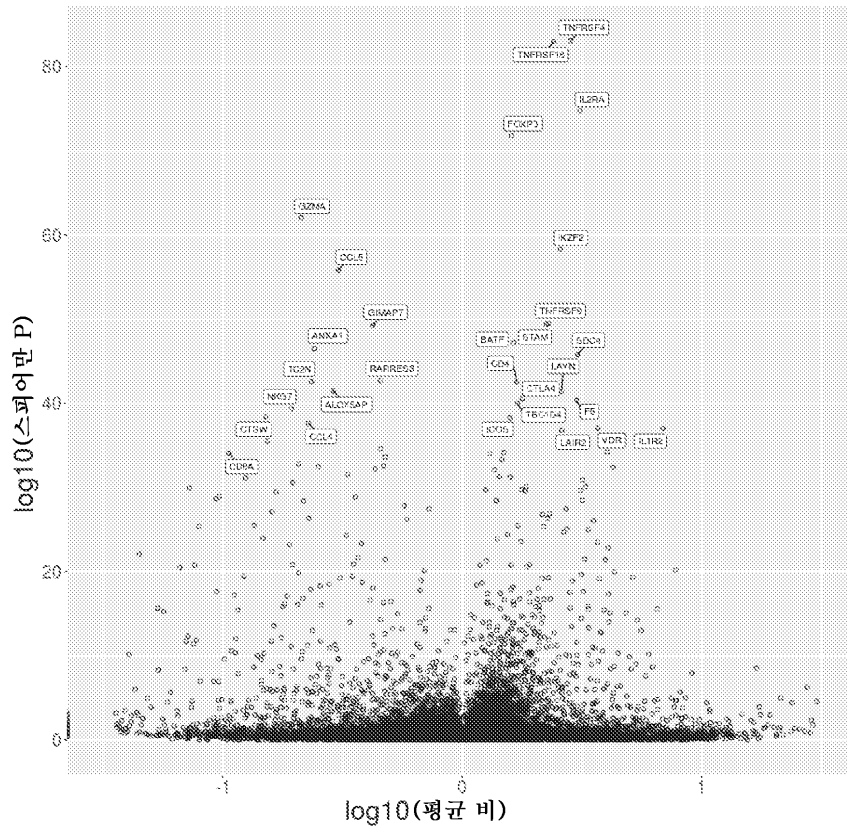
도면1ii

도 1B



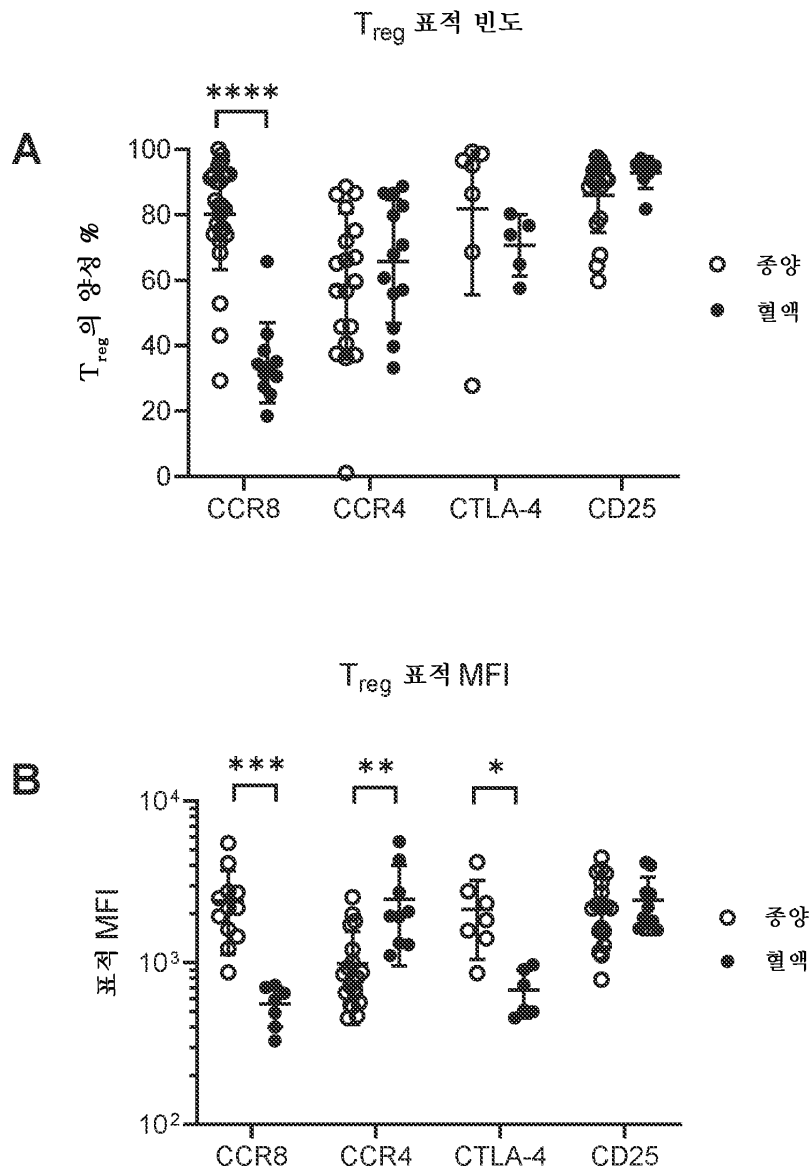
도면1iii

도 1C



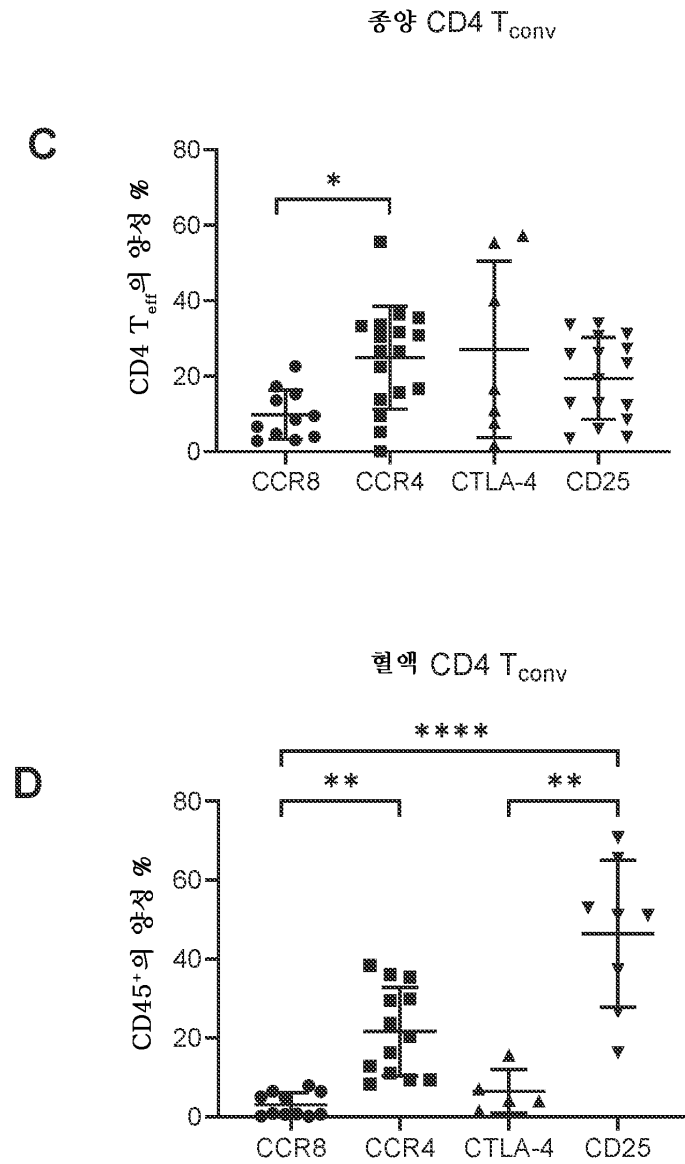
도면2i

도 2A 및 2B



도면2ii

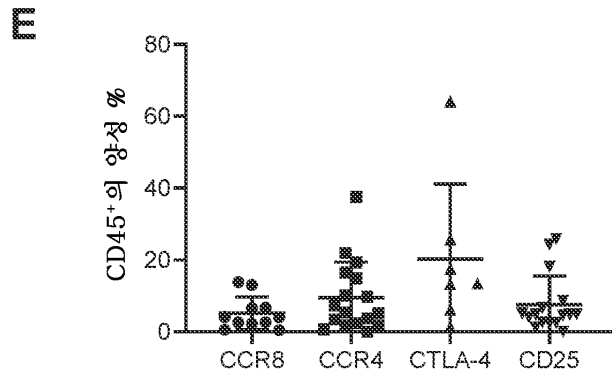
도 2C 및 2D



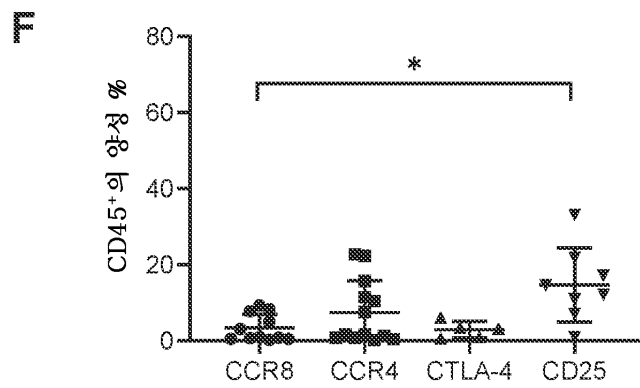
도면2iii

도 2E 및 2F

종양 CD8⁺ T 세포

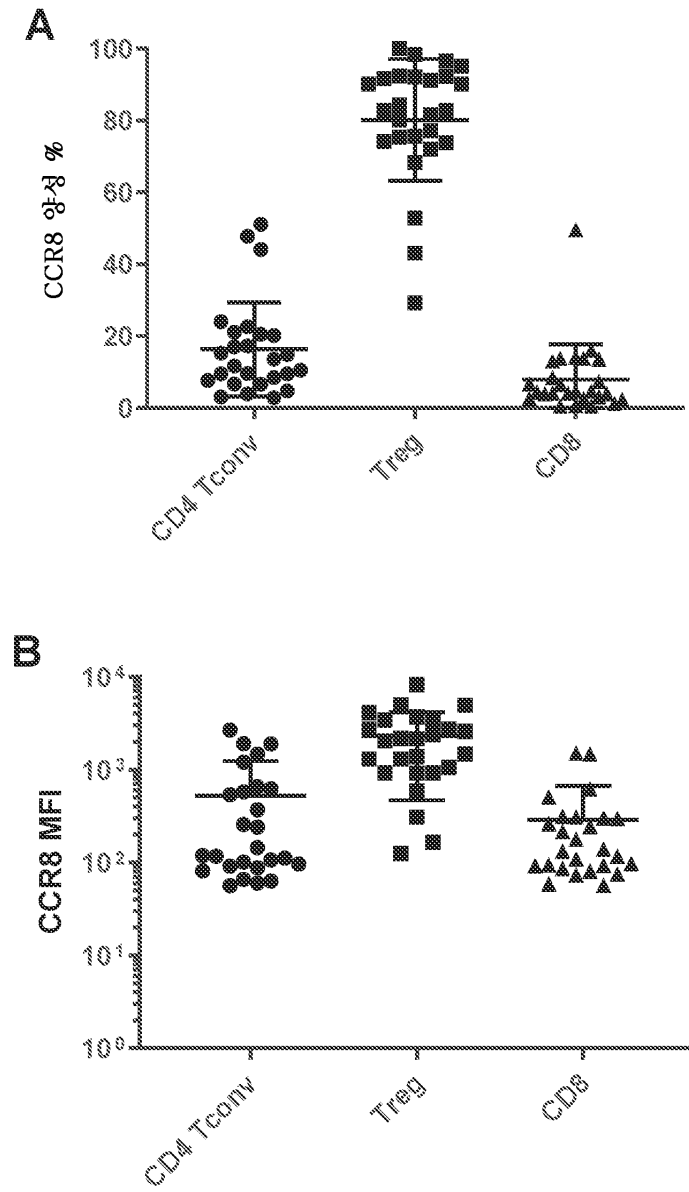


혈액 CD8⁺ T 세포



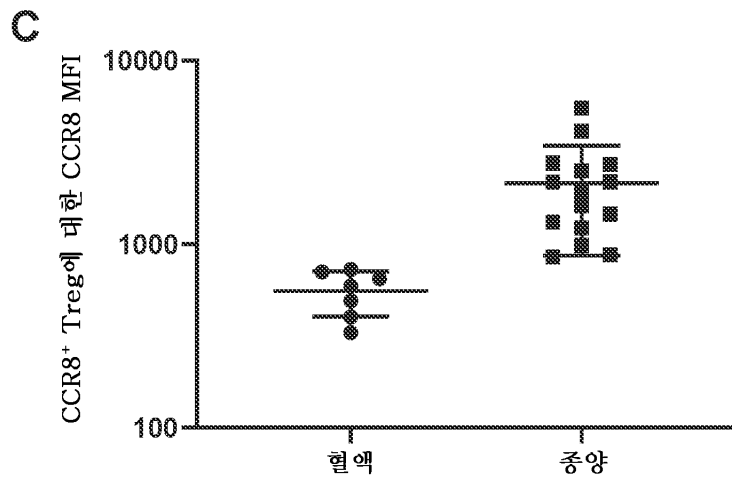
도면3i

도 3A 및 3B



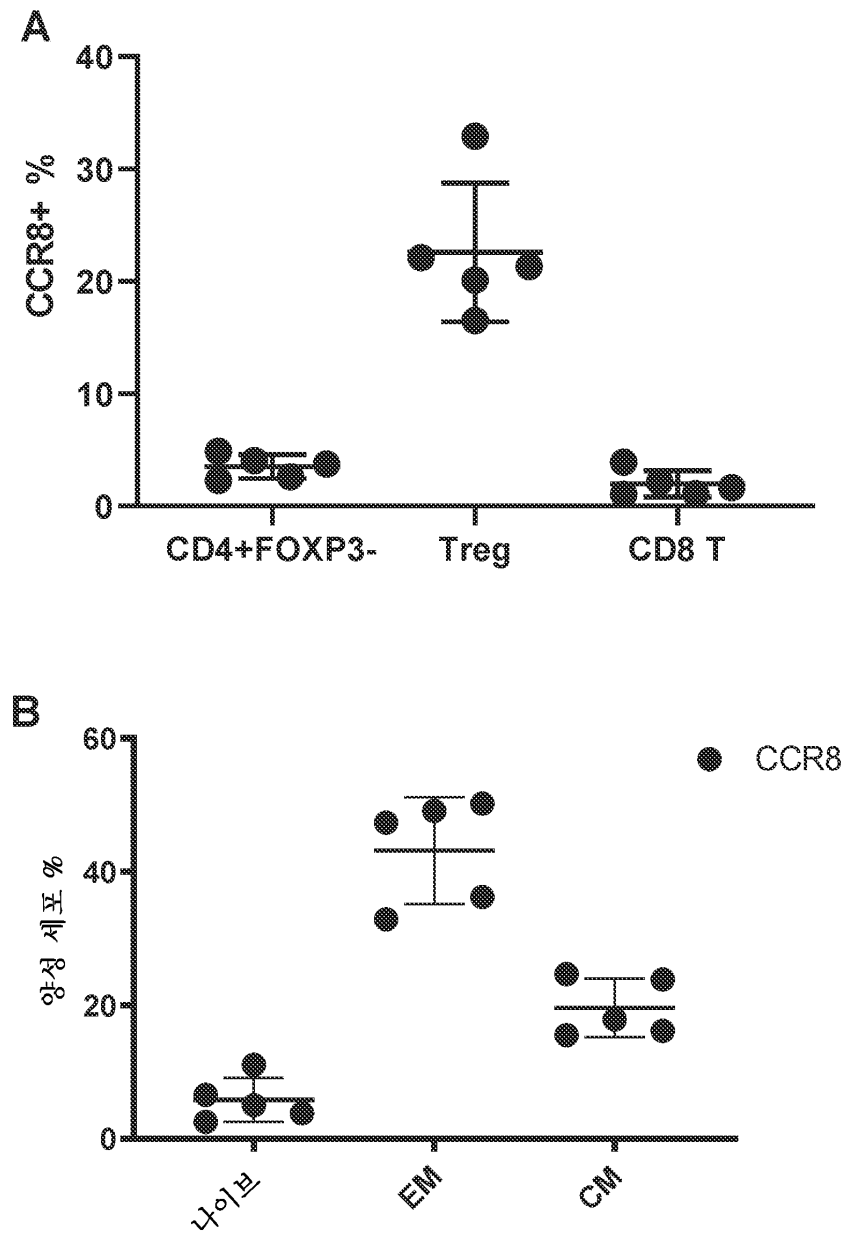
도면3ii

도 3C



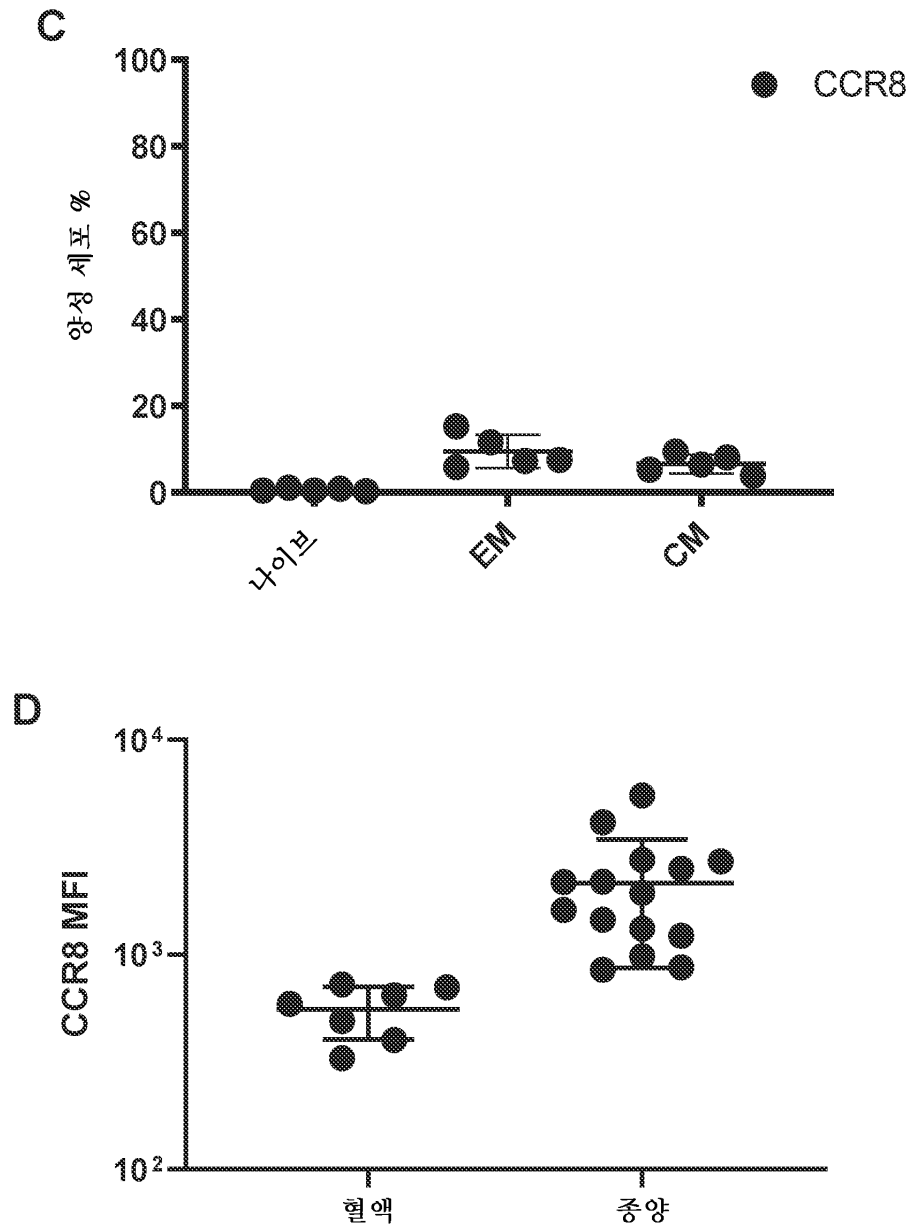
도면4i

도 4A 및 4B



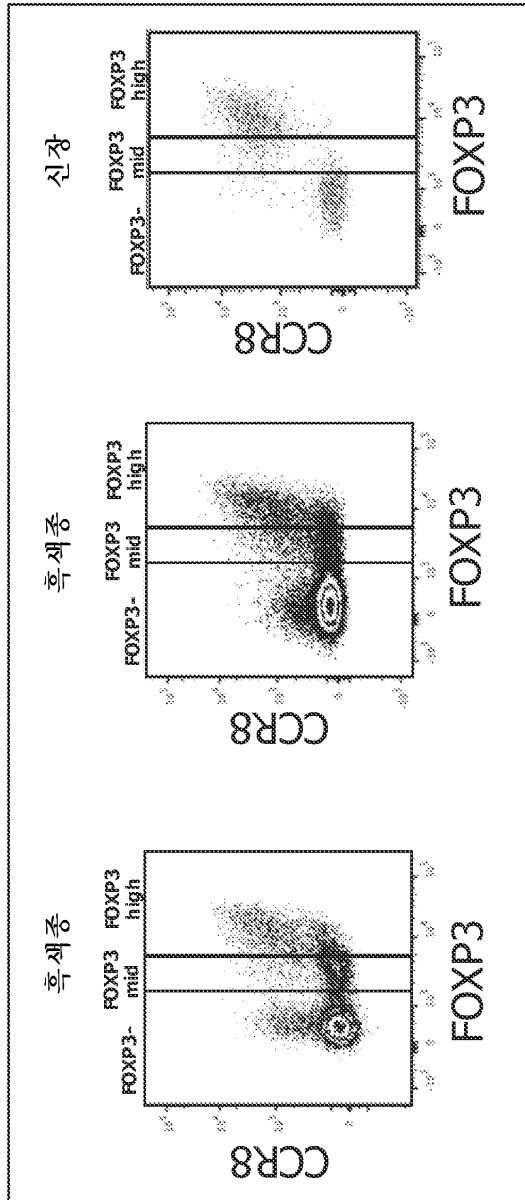
도면4ii

도 4C 및 4D



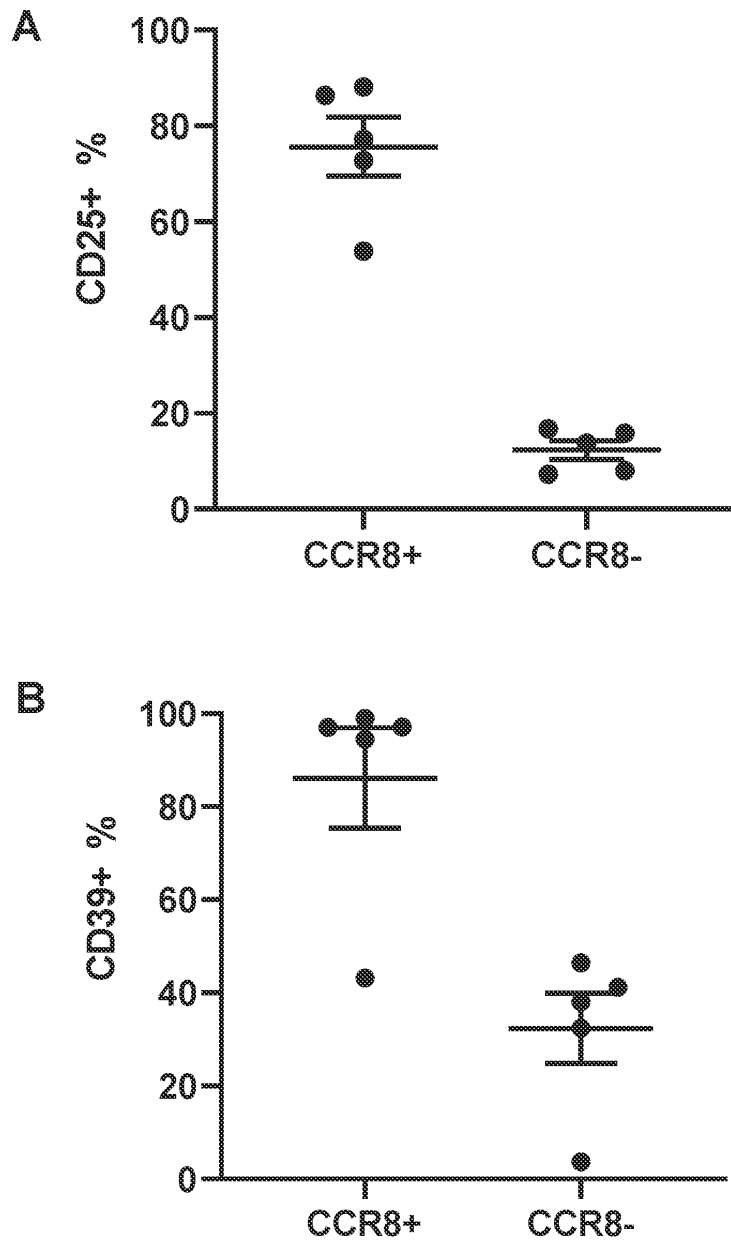
도면5

도 5



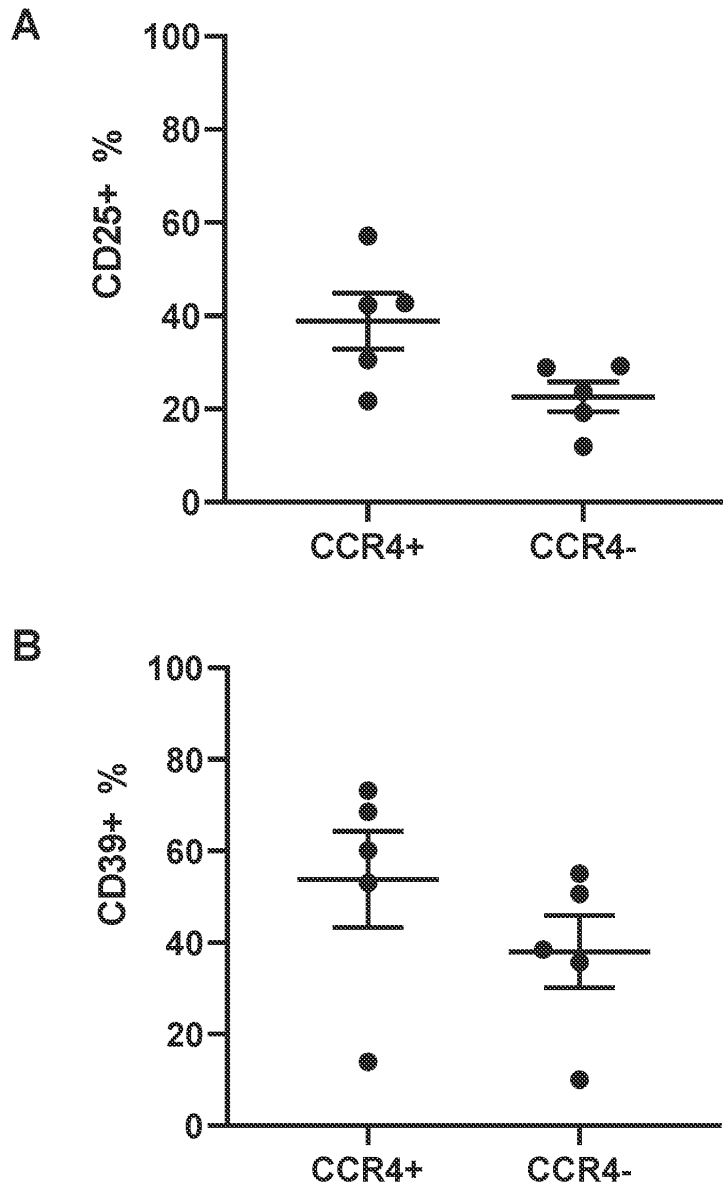
도면6i

도 6A 및 6B



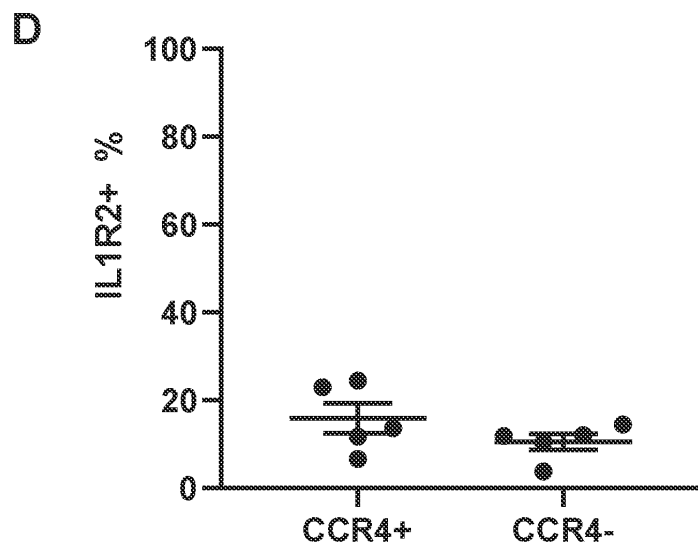
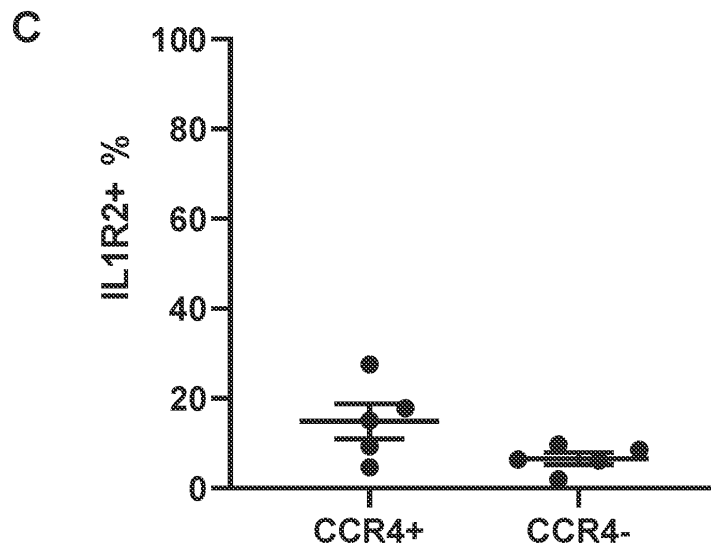
도면7i

도 7A 및 7B



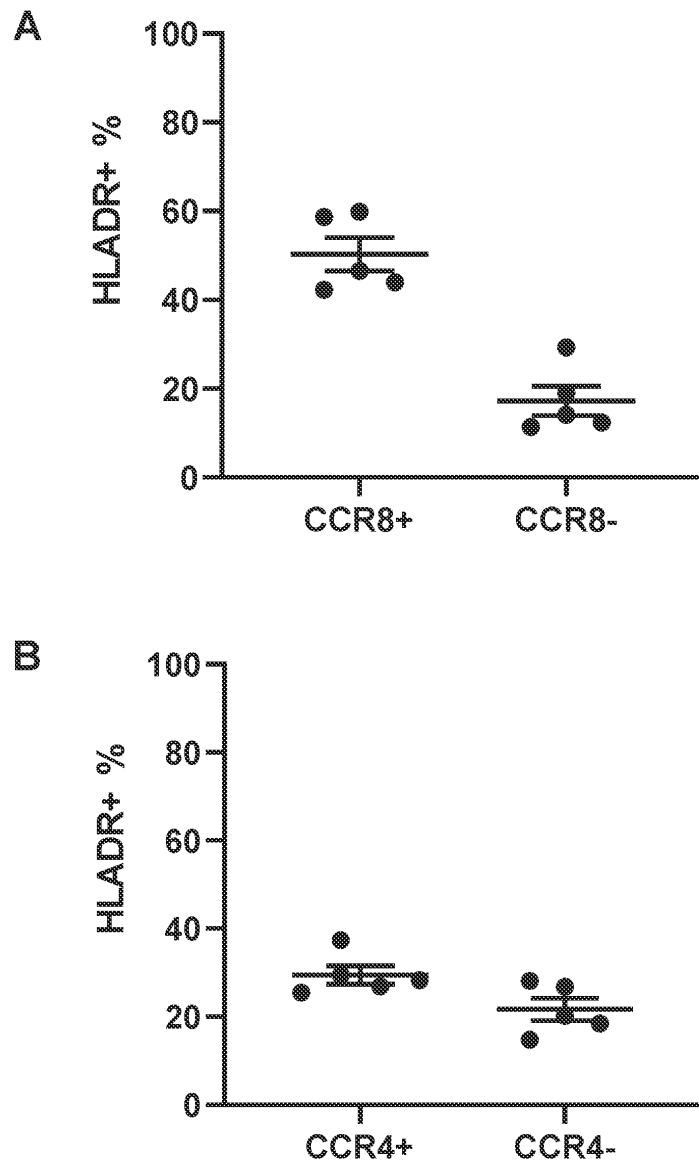
도면7ii

도 7C 및 7D



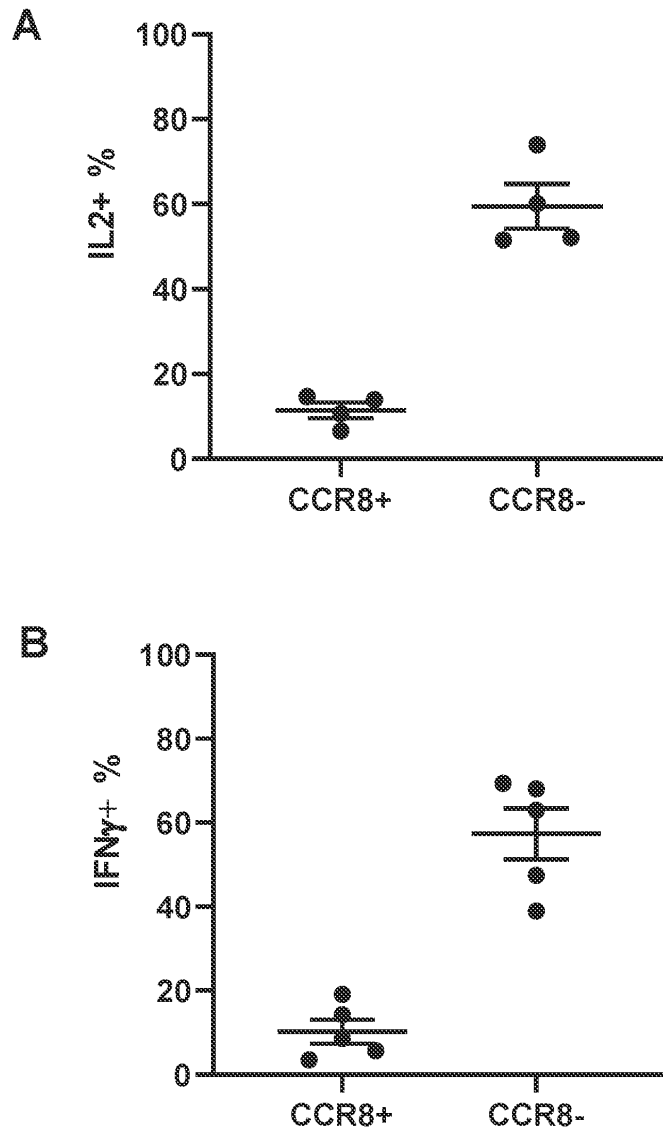
도면8

도 8A 및 8B



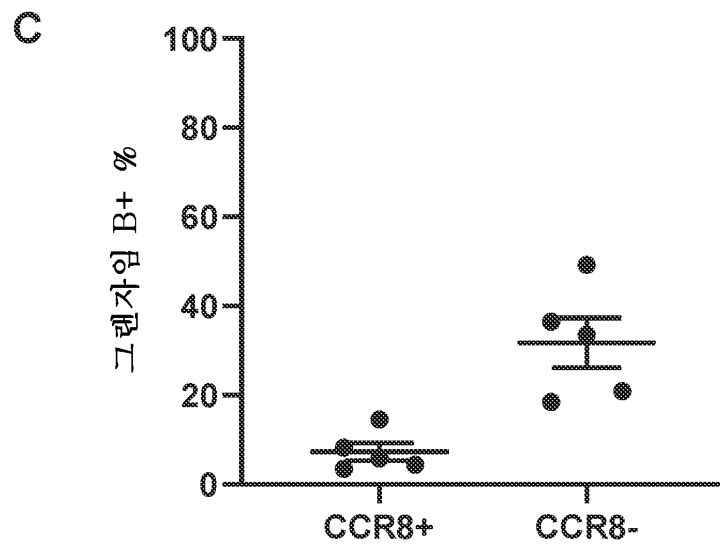
도면9i

도 9A 및 9B



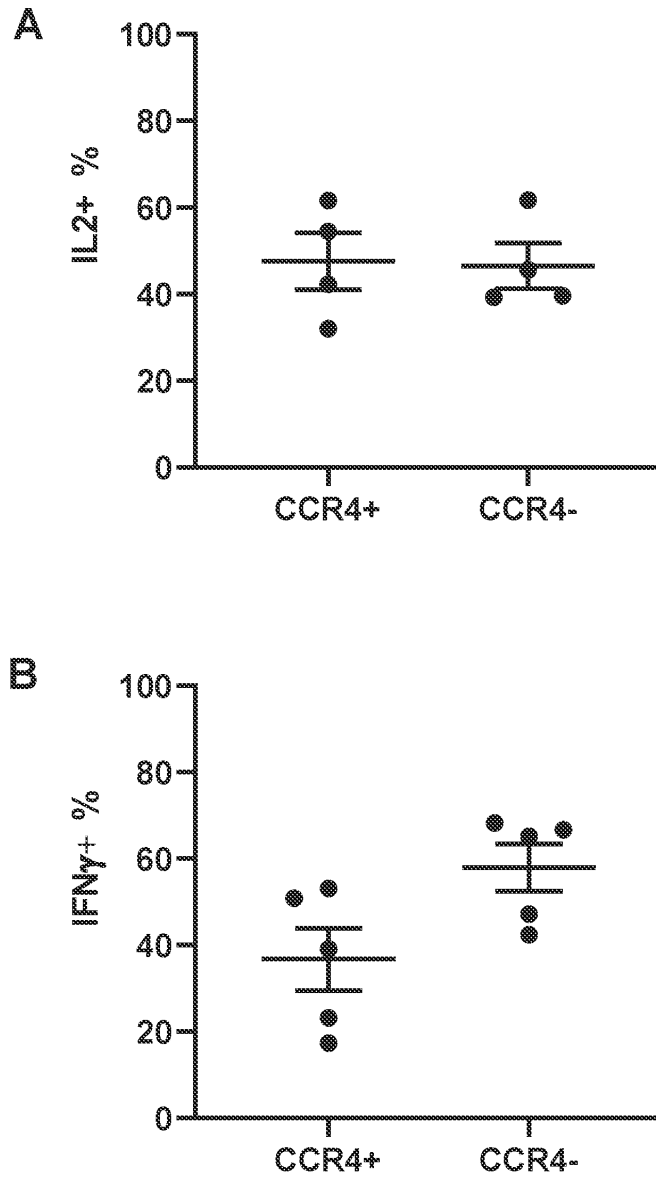
도면9ii

도 9C



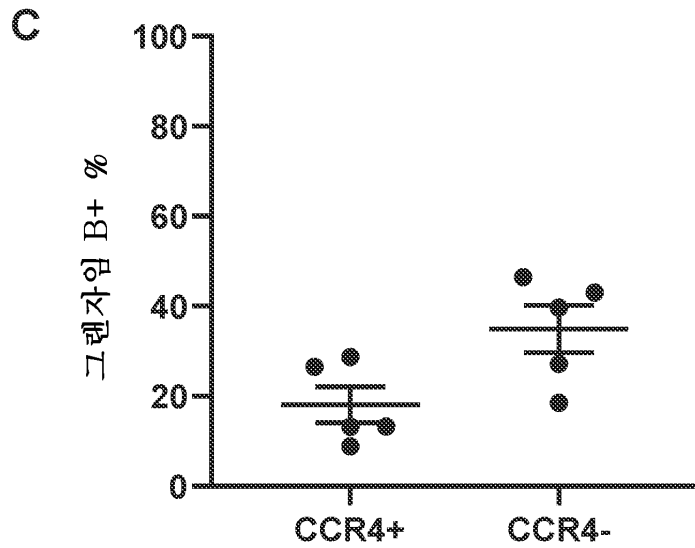
도면10i

도 10A 및 10B



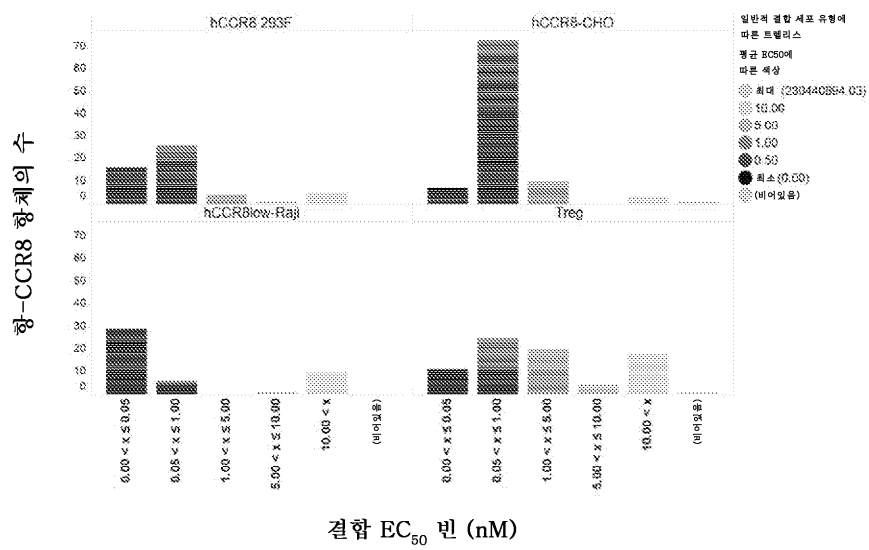
도면10i

도 10C



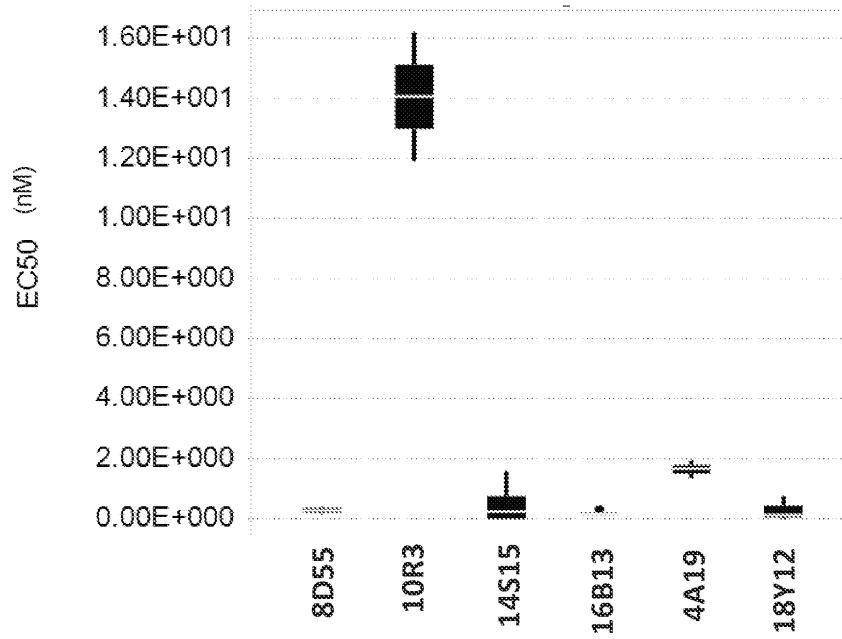
도면11i

도 11A



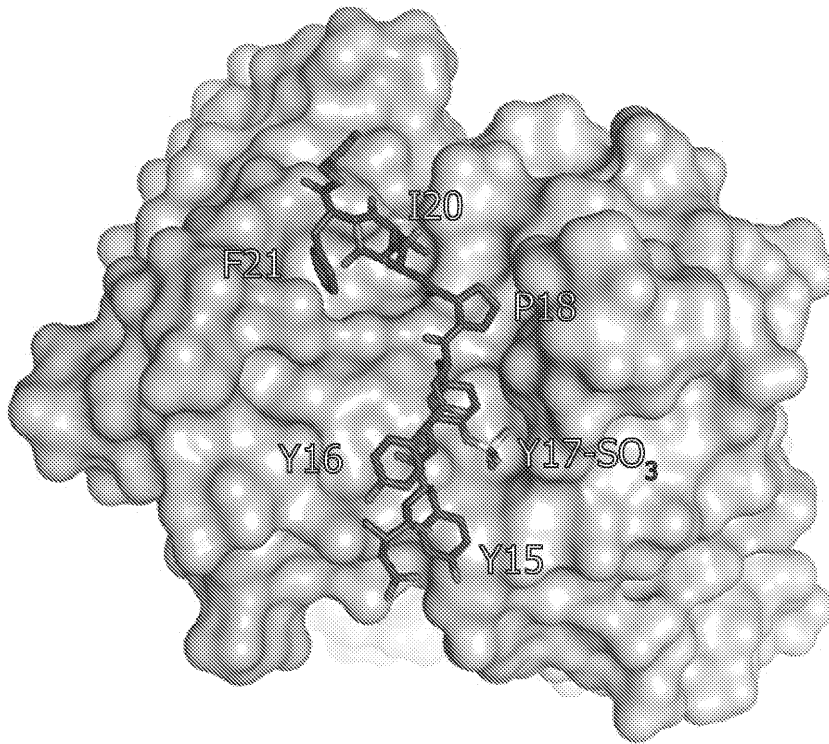
도면11ii

도 11B



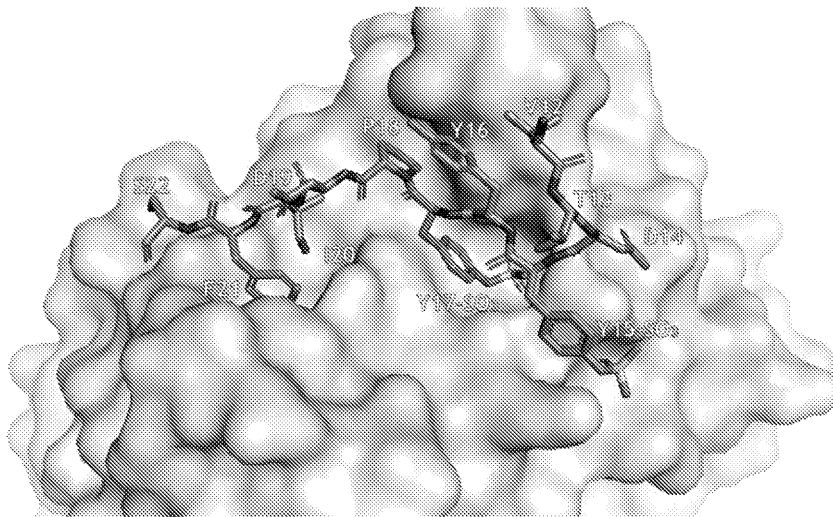
도면12i

도 12A



도면12ii

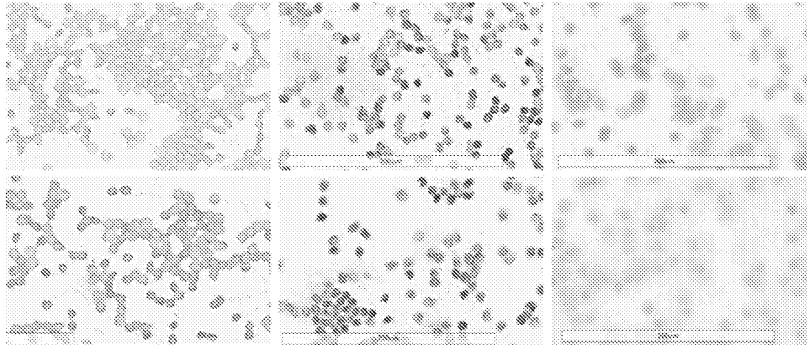
도 12B



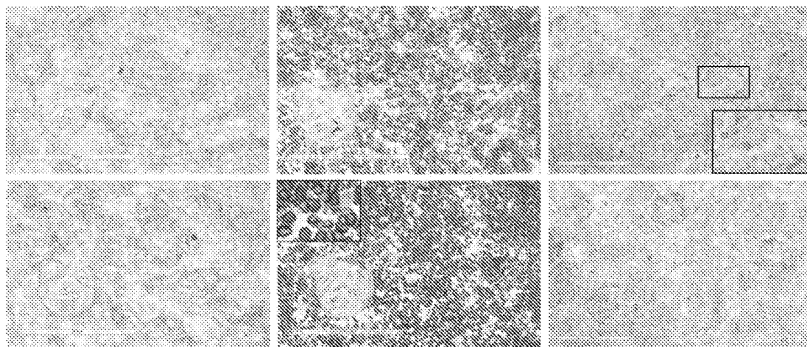
도면13

도 13A 및 13B

A

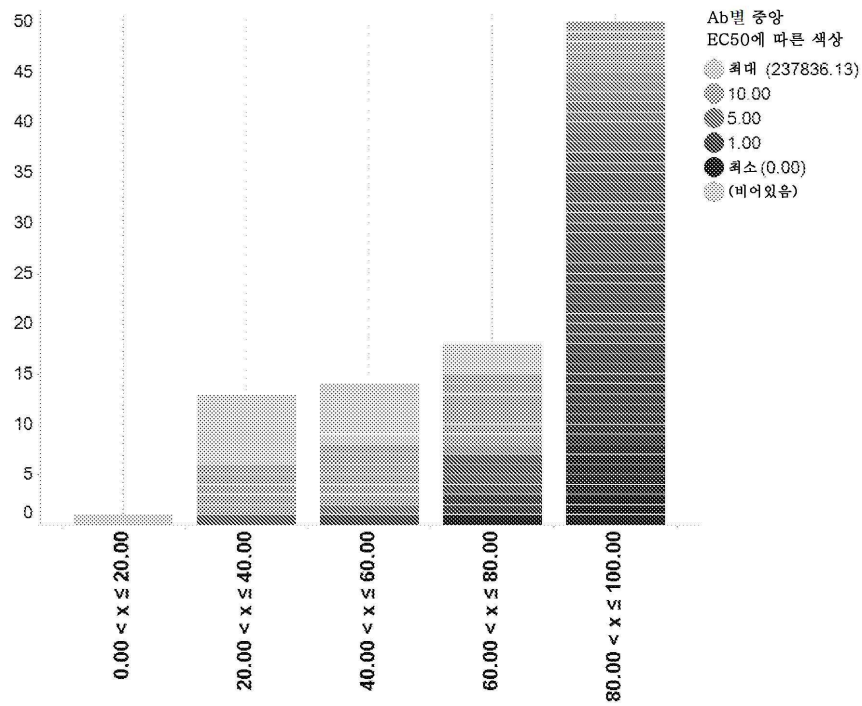


B



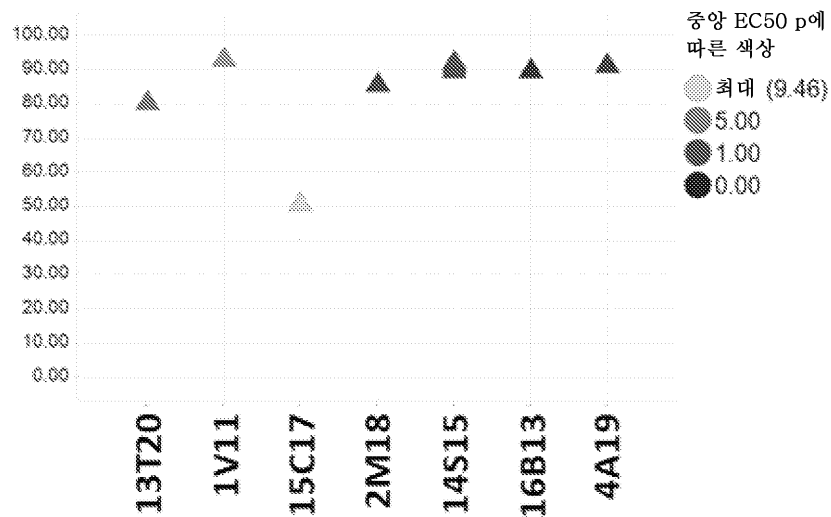
도면14i

도 14A



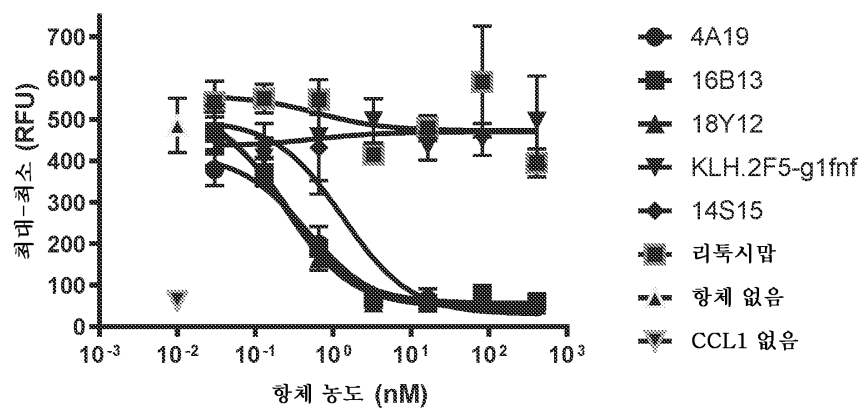
도면14ii

도 14B



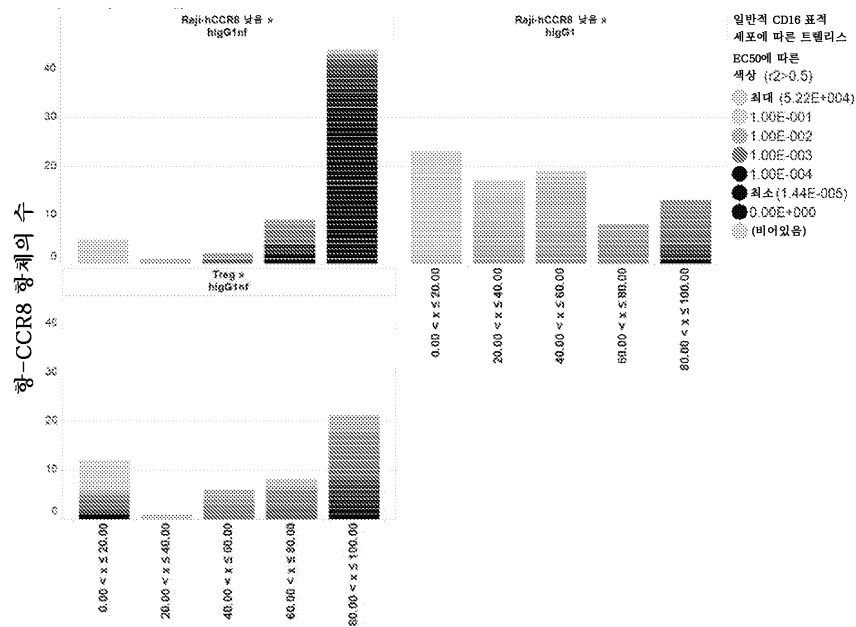
도면14iii

도 14C



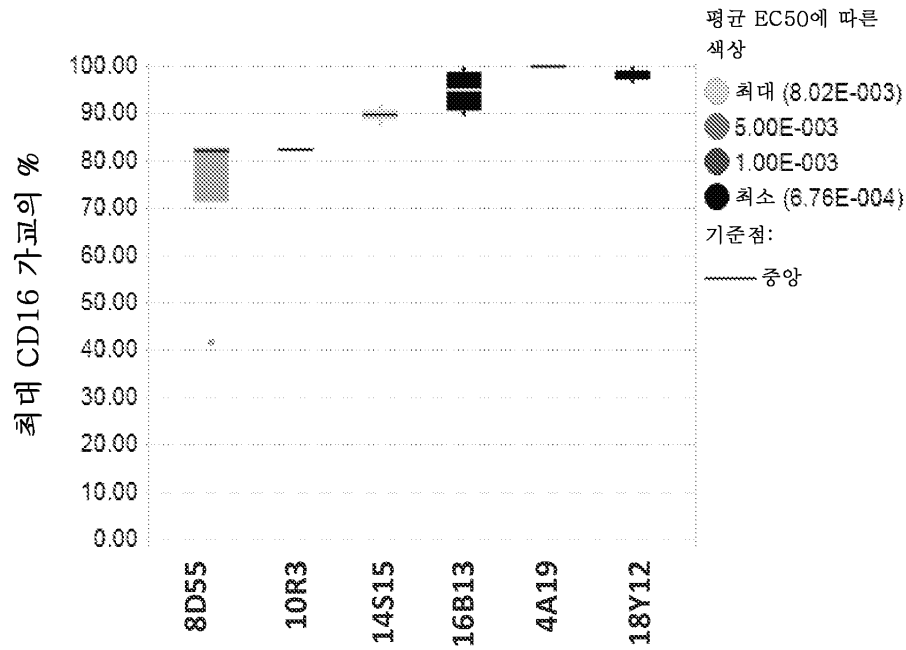
도면15i

도 15A



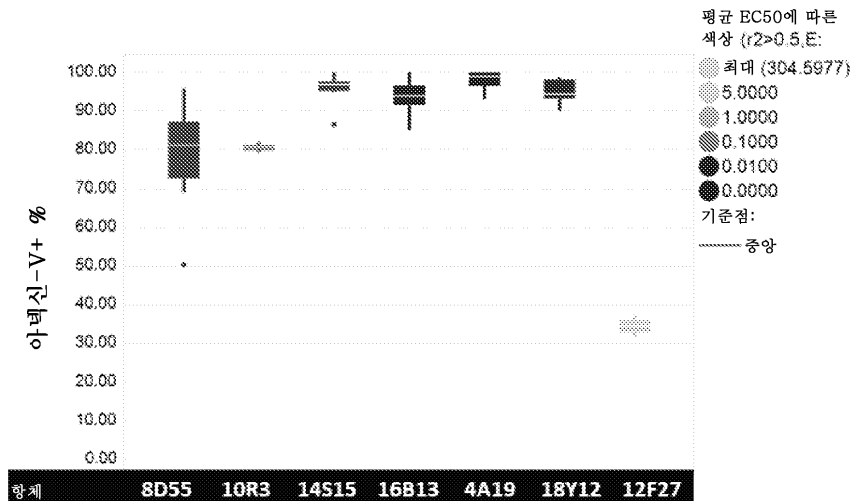
도면15i

도 15B



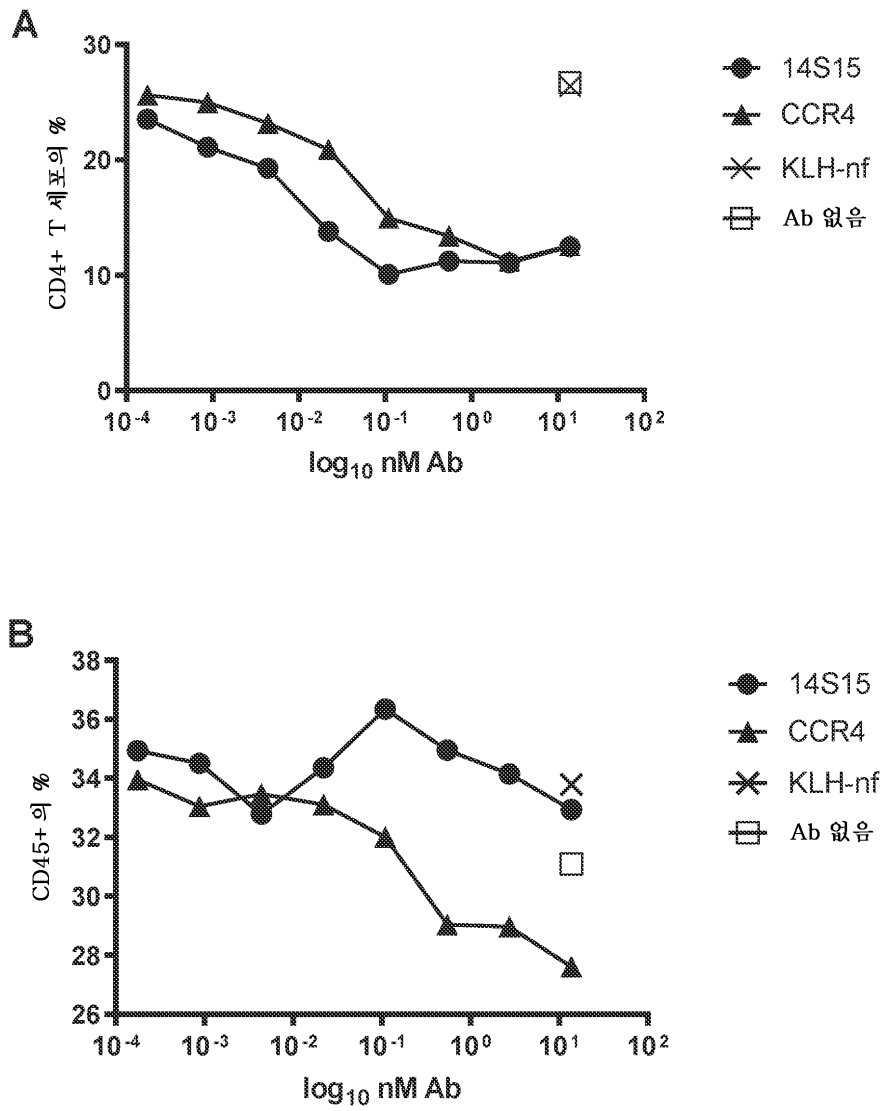
도면16

도 16



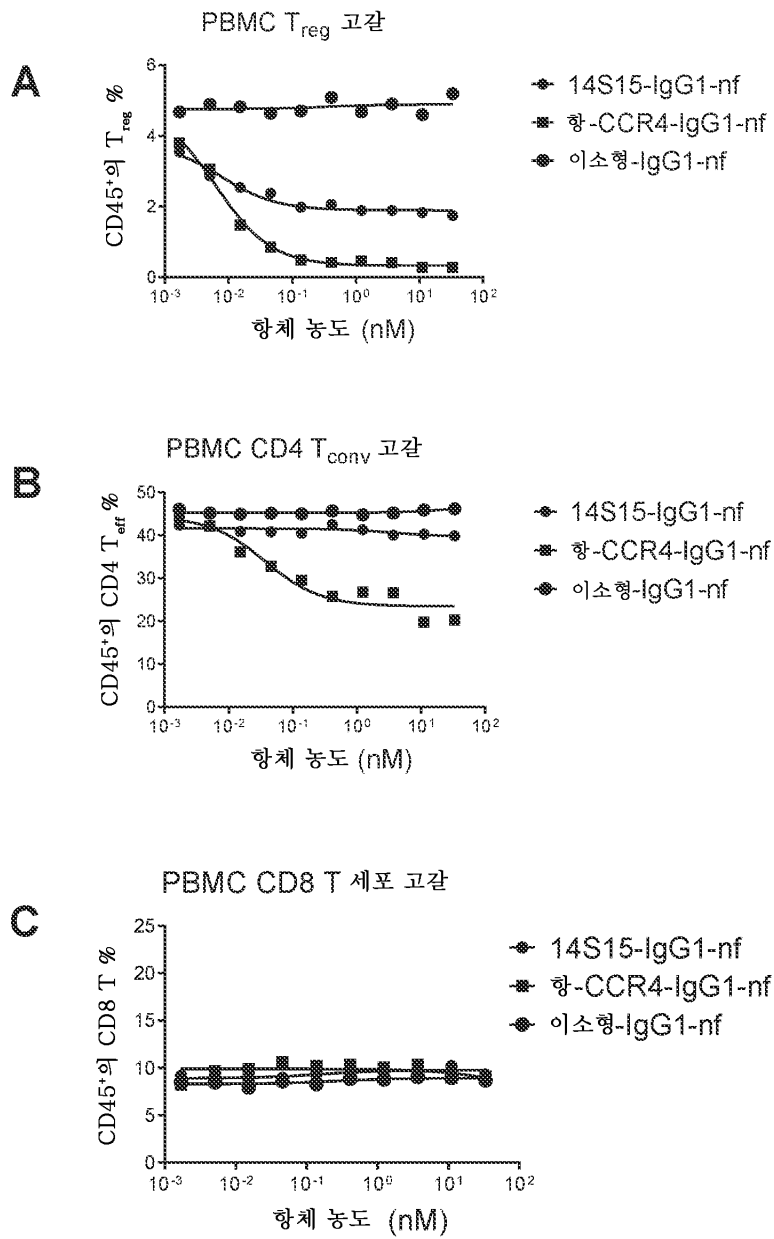
도면17

도 17A 및 17B



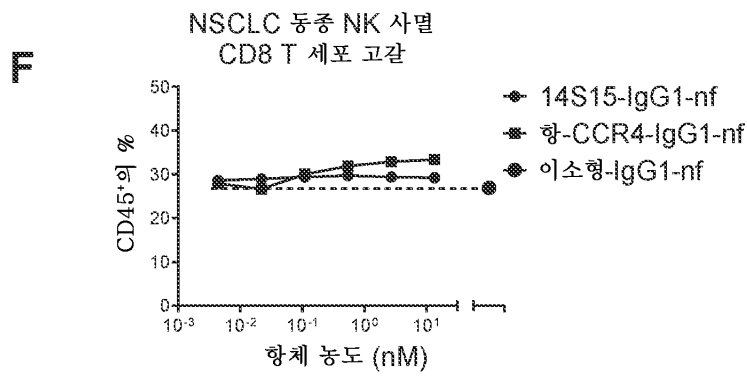
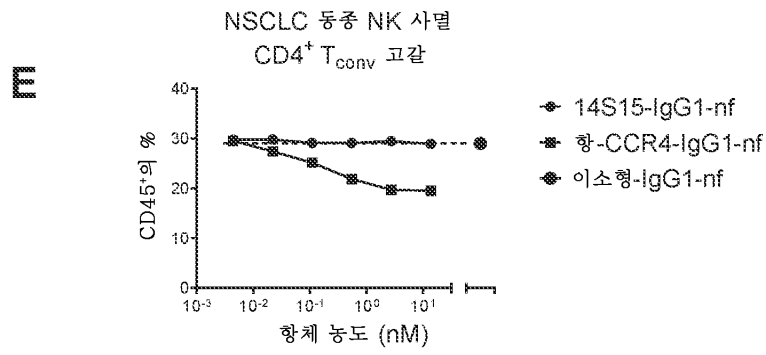
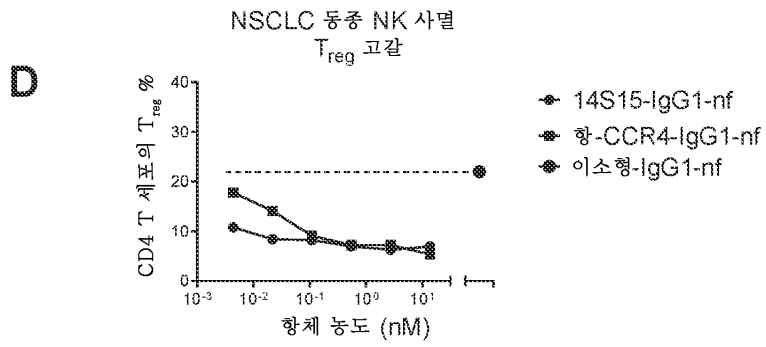
도면18i

도 18A-18C



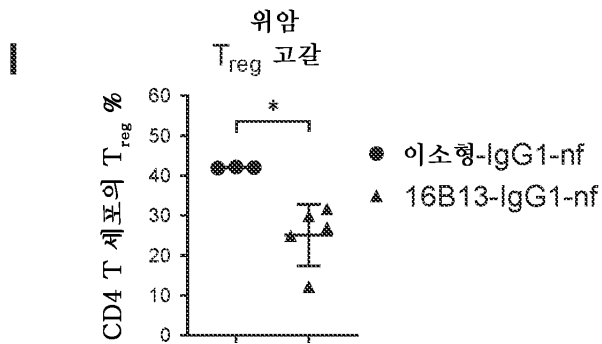
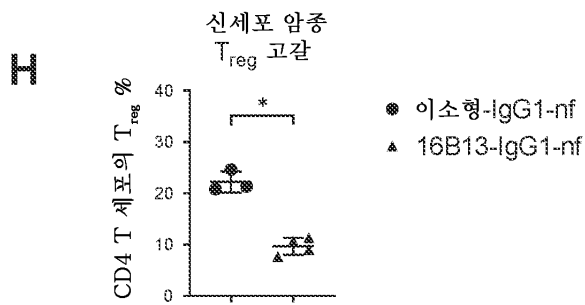
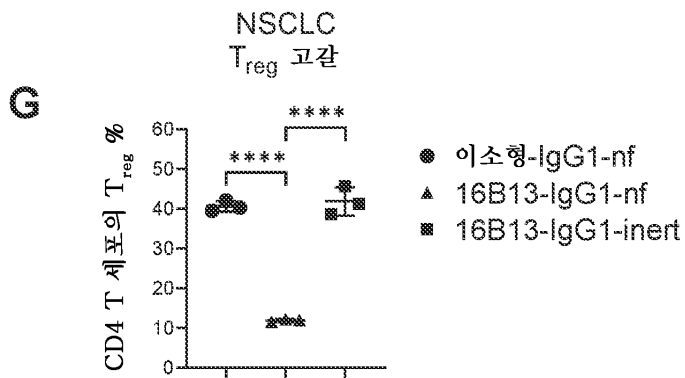
도면18ii

도 18D-18F



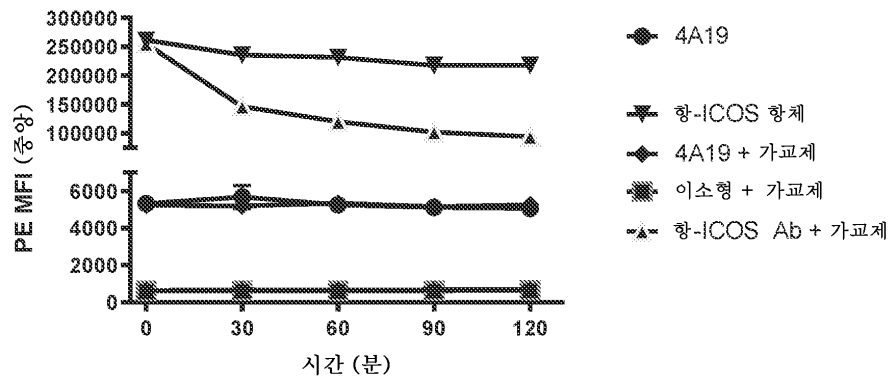
도면18iii

도 18G-18I



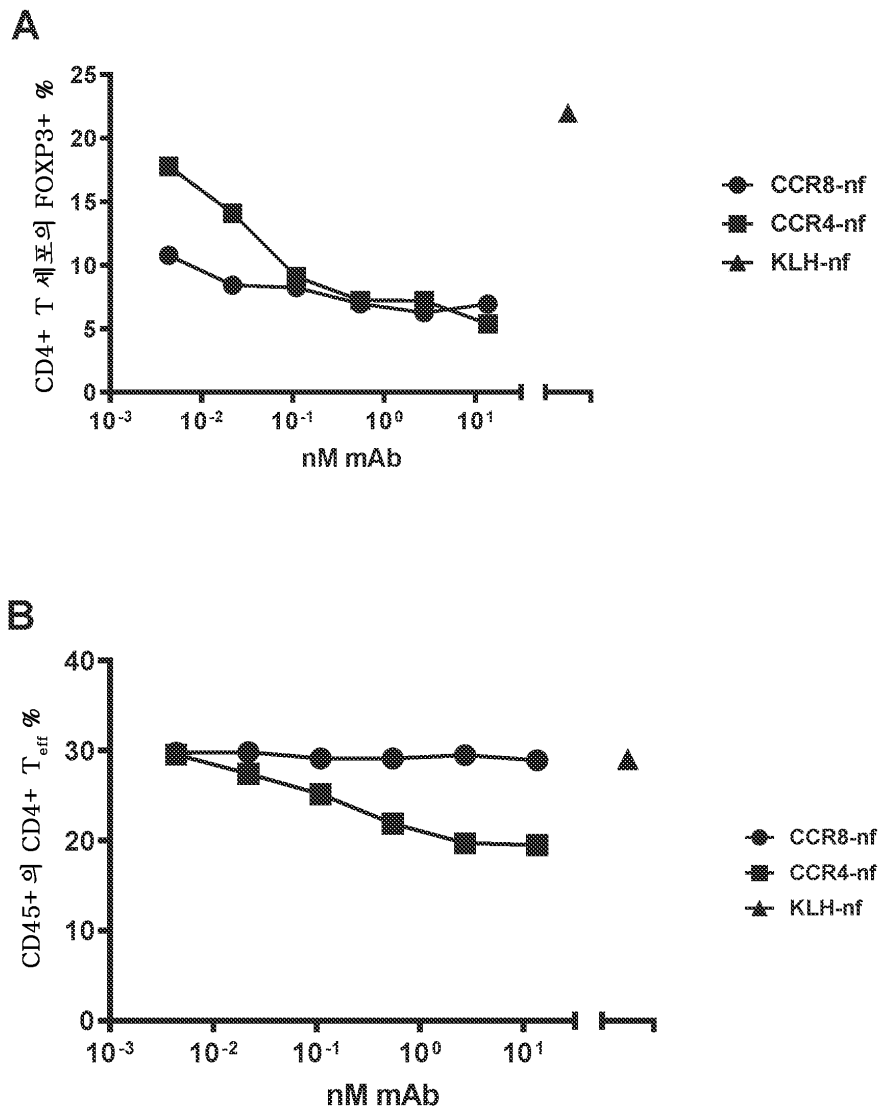
도면19

도 19



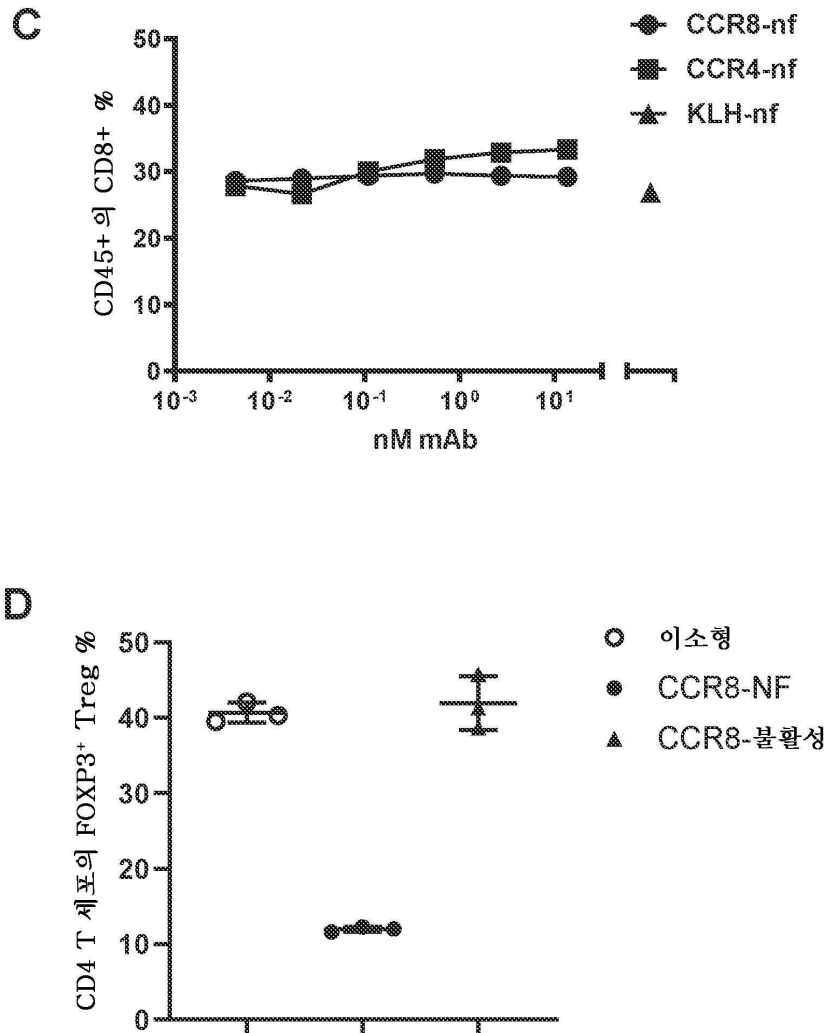
도면20i

도 20A 및 20B



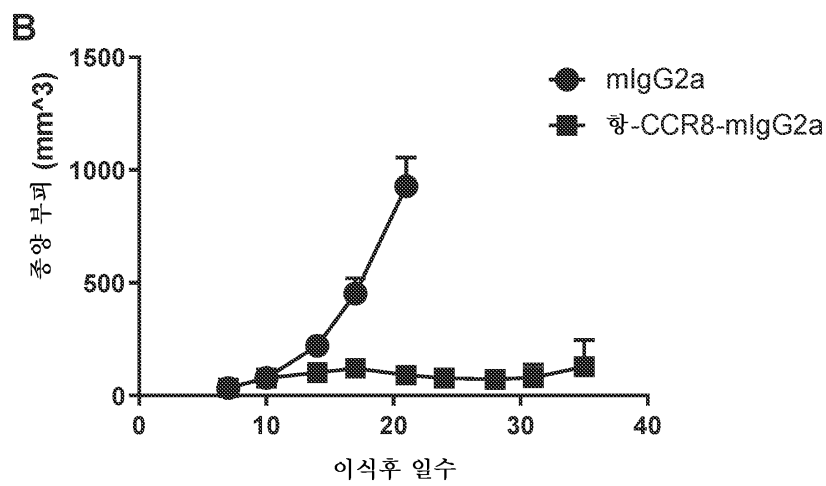
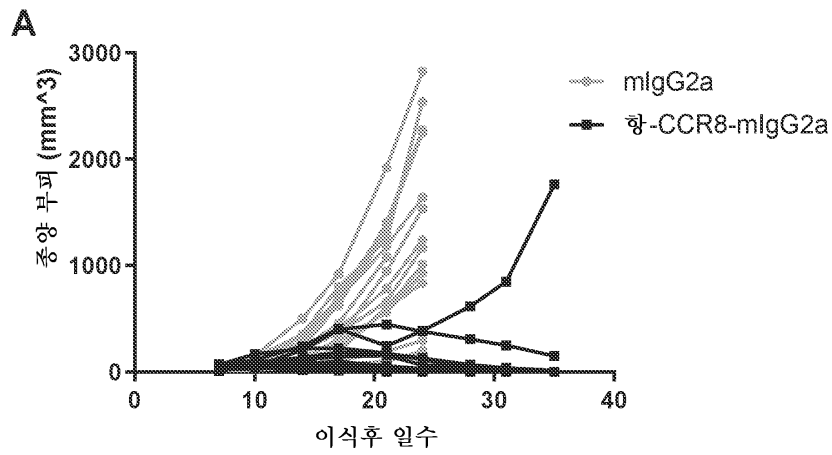
도면20ii

도 20C 및 20D



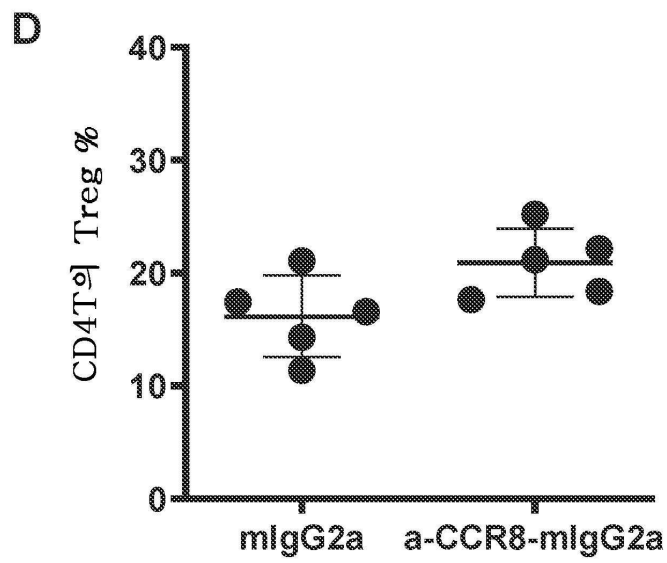
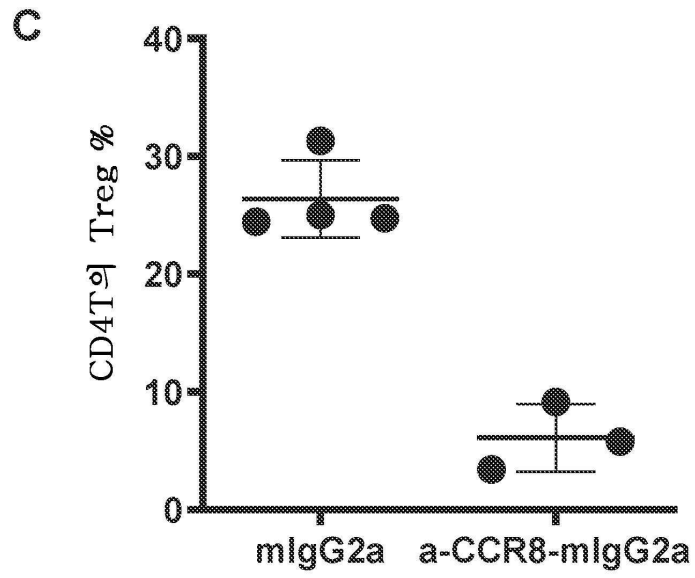
도면21i

도 21A 및 21B



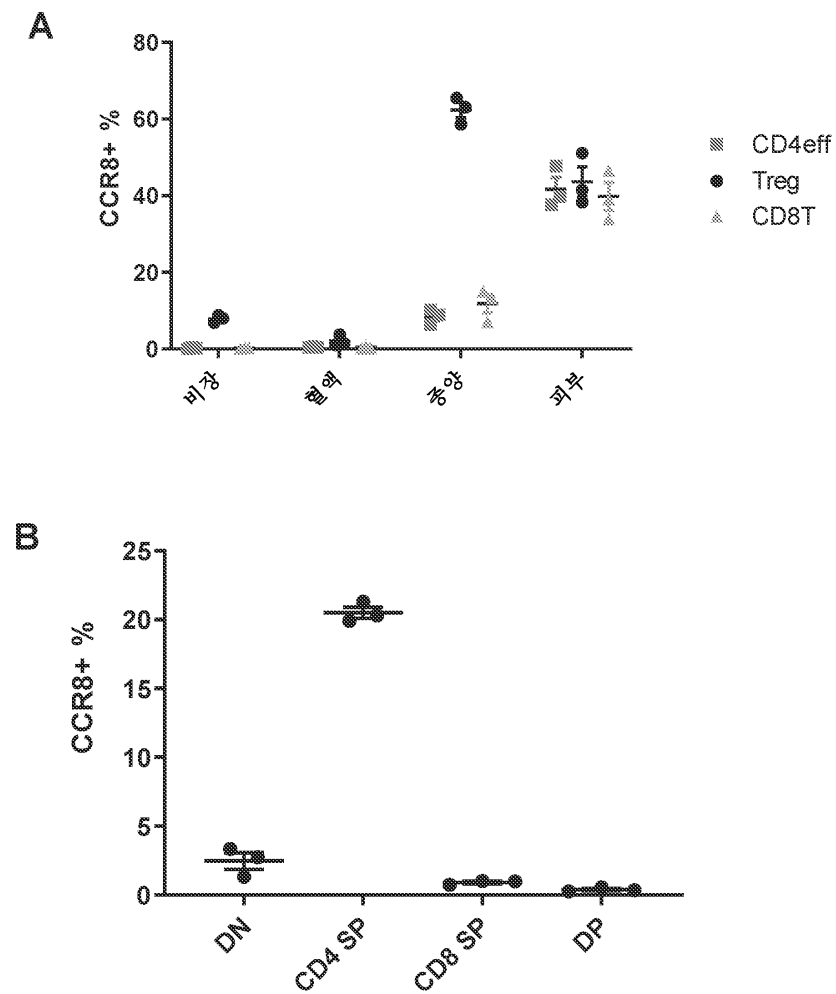
도면21ii

도 21C 및 21D



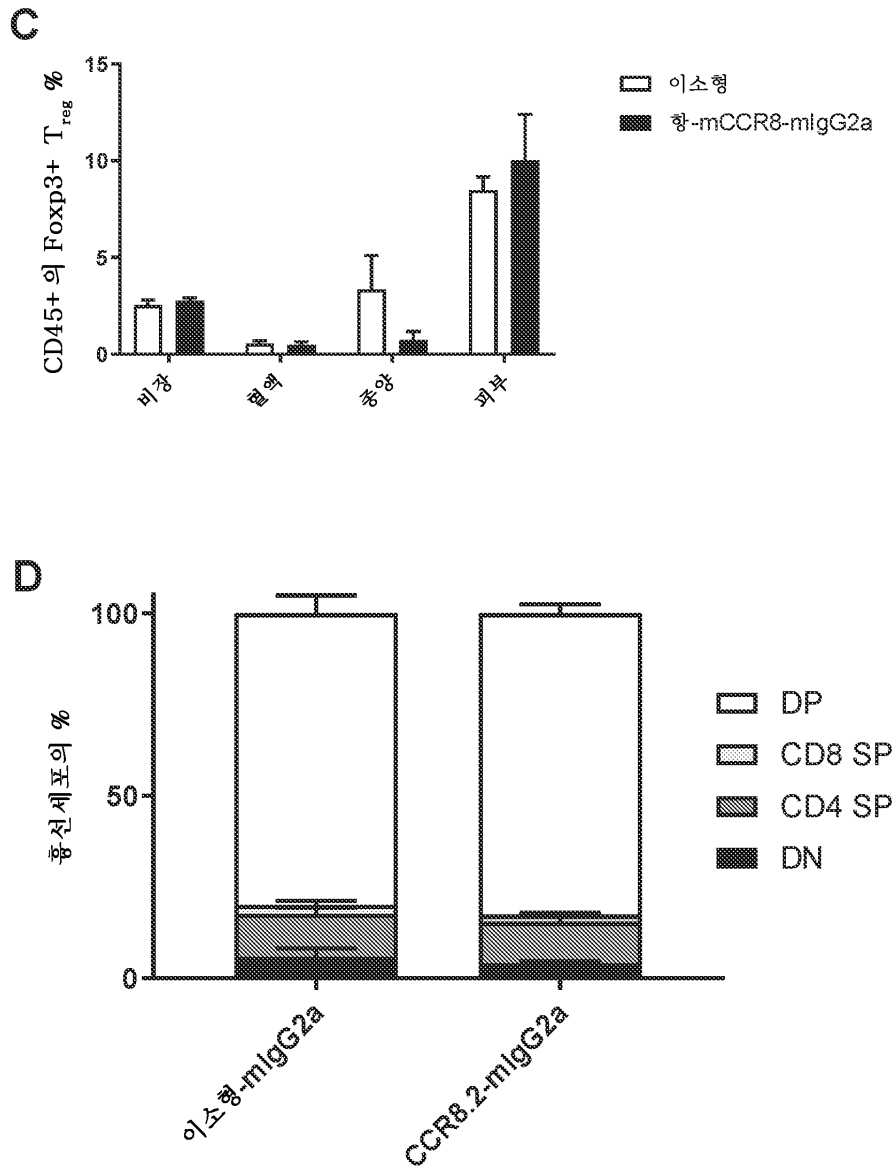
도면22i

도 22A 및 22B



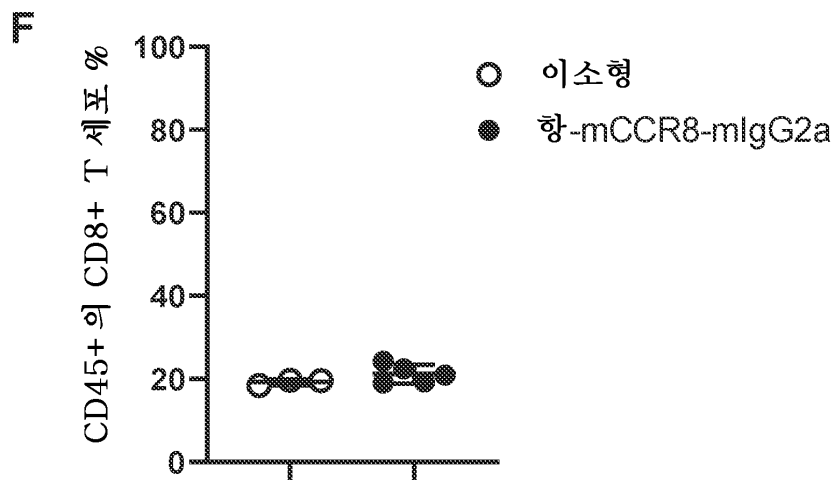
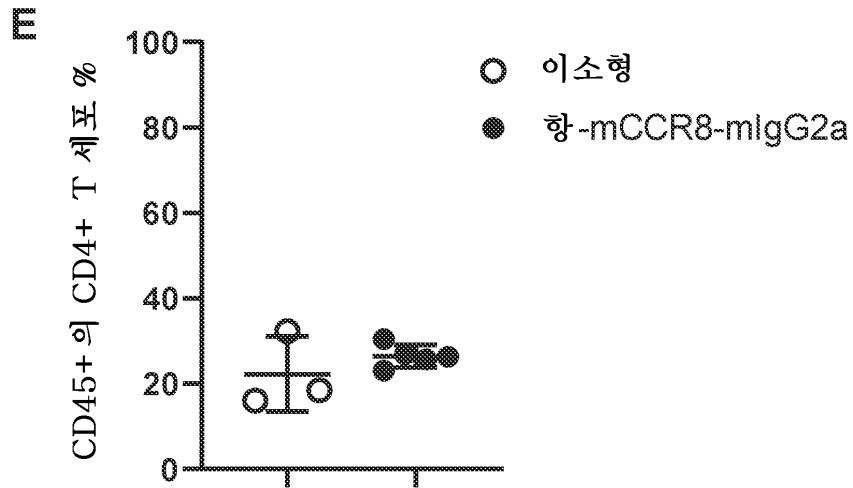
도면22ii

도 22C 및 22D



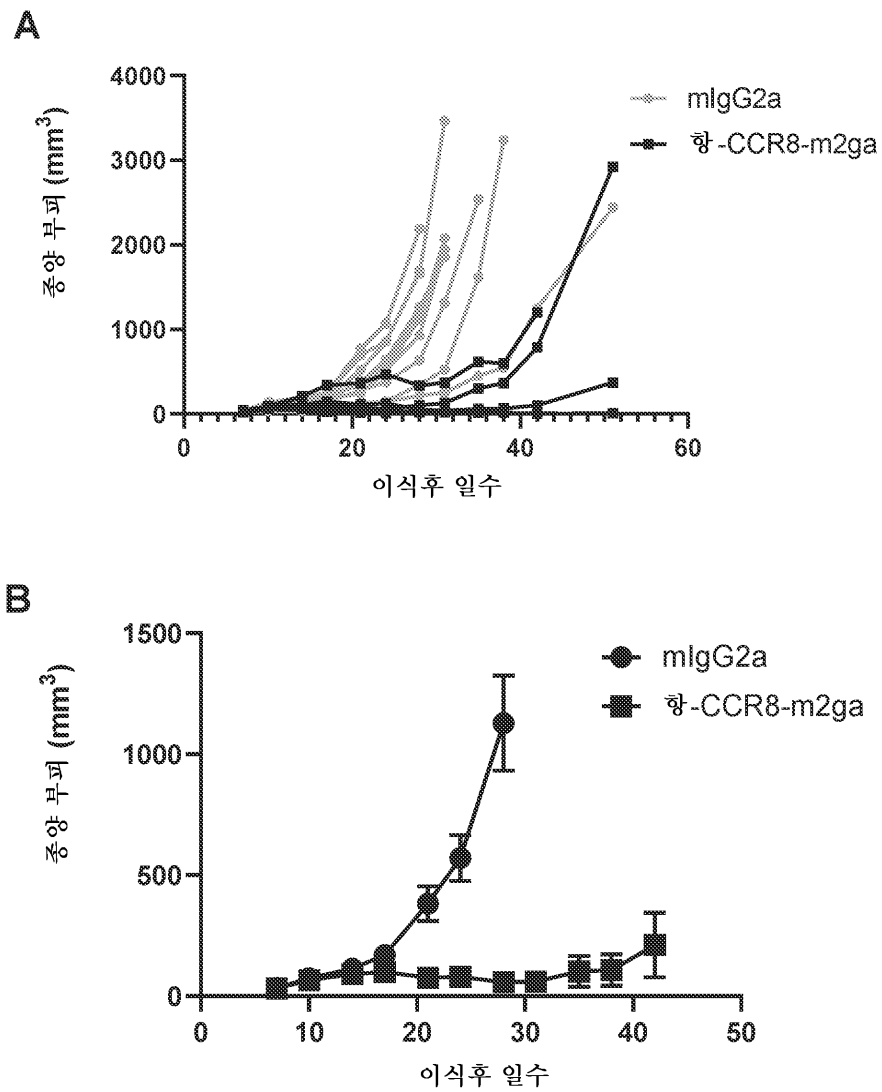
도면22iii

도 22E 및 22F



도면23

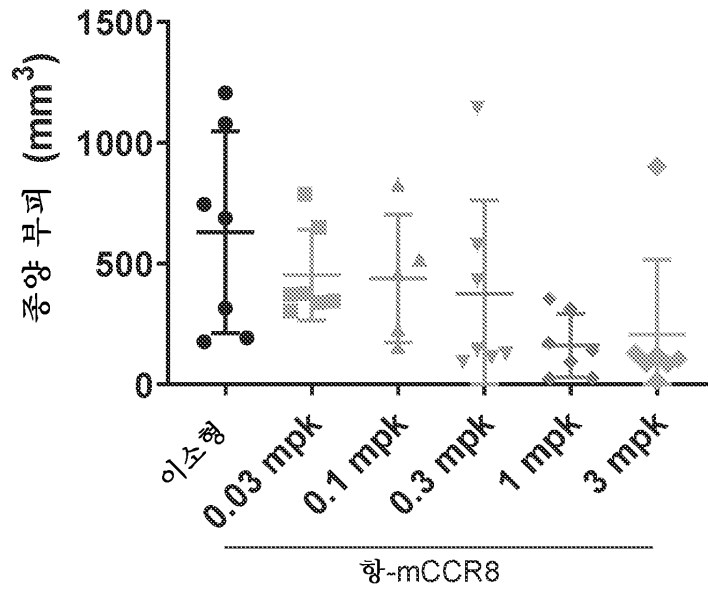
도 23A 및 23B



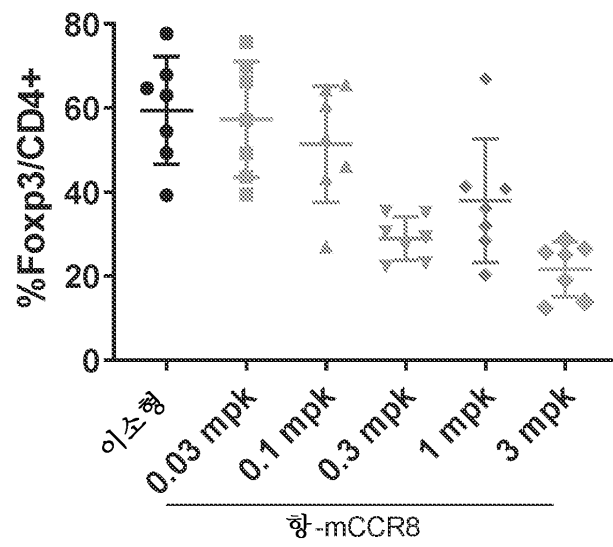
도면24i

도 24A 및 24B

A



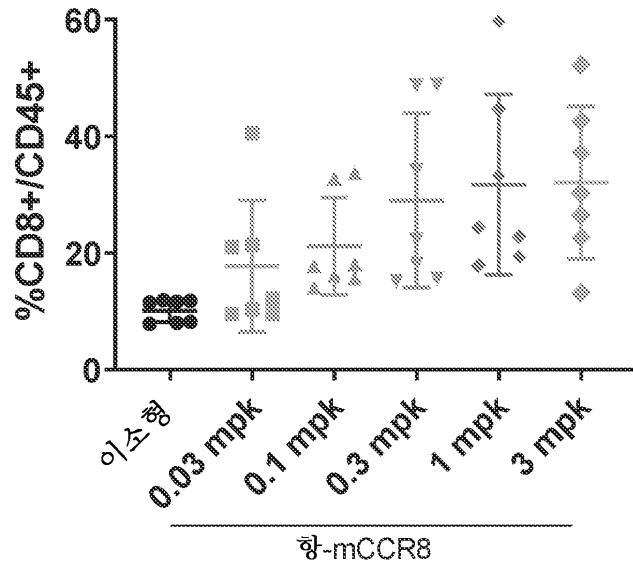
B



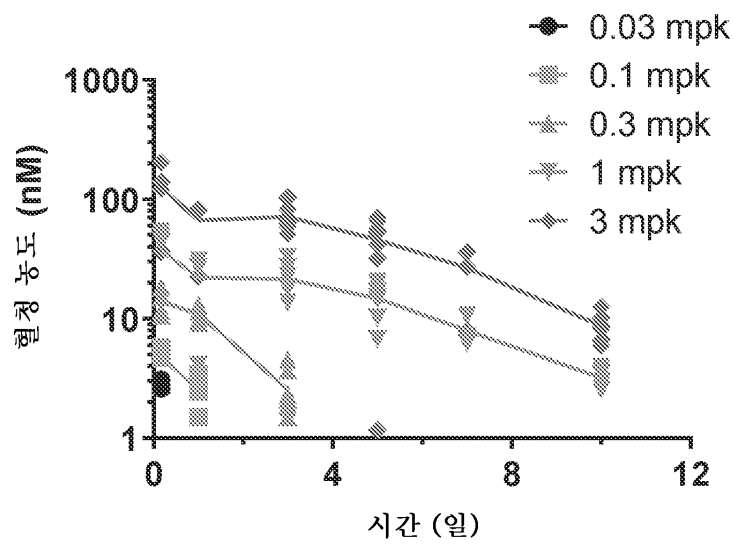
도면24ii

도 24C 및 24D

C

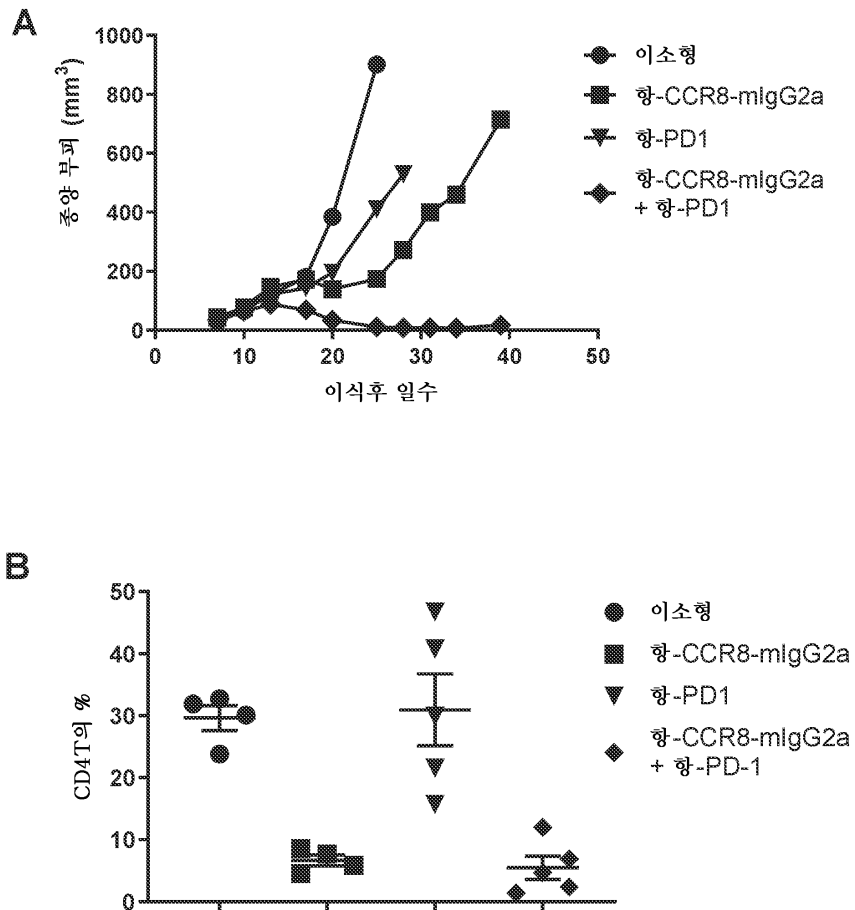


D



도면25i

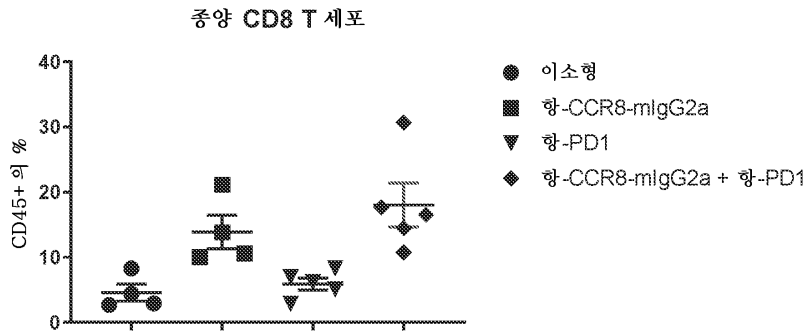
도 25A 및 25B



도면25ii

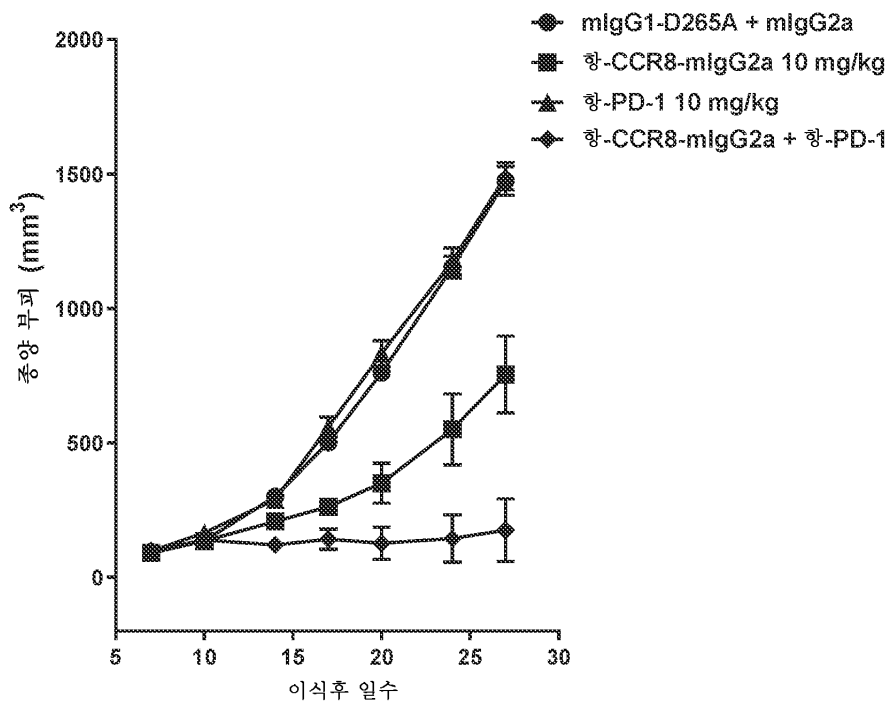
도 25C

C



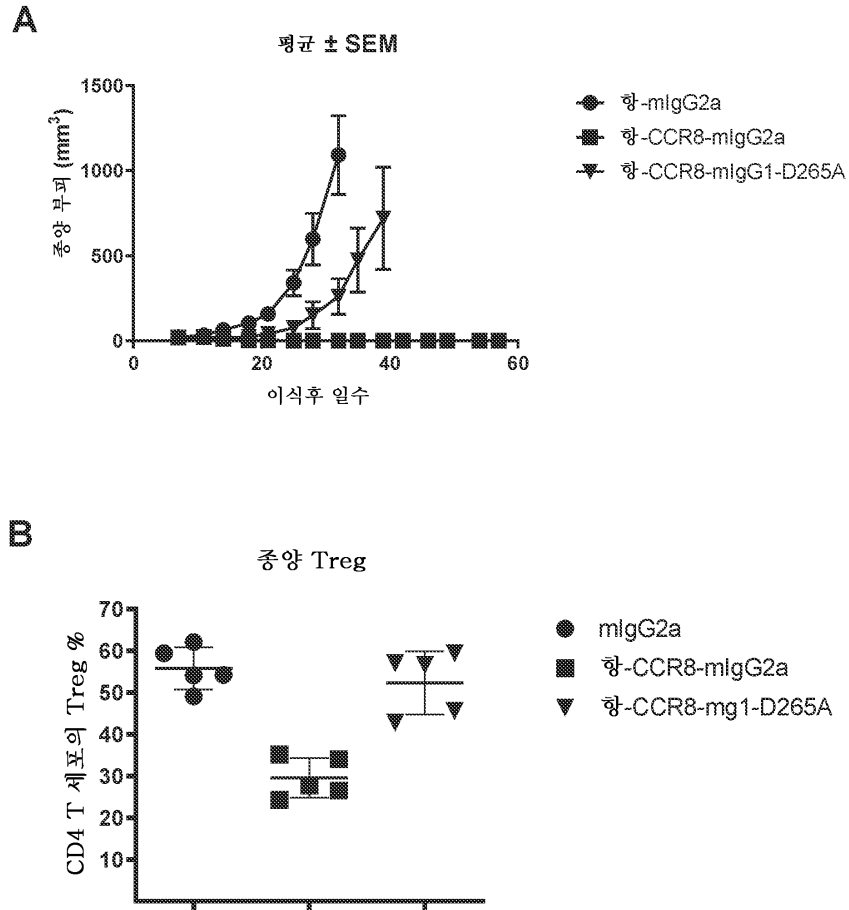
도면26

도 26



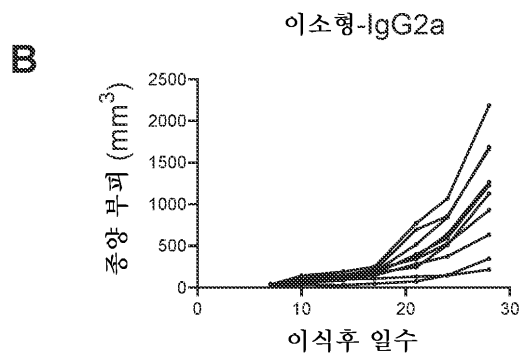
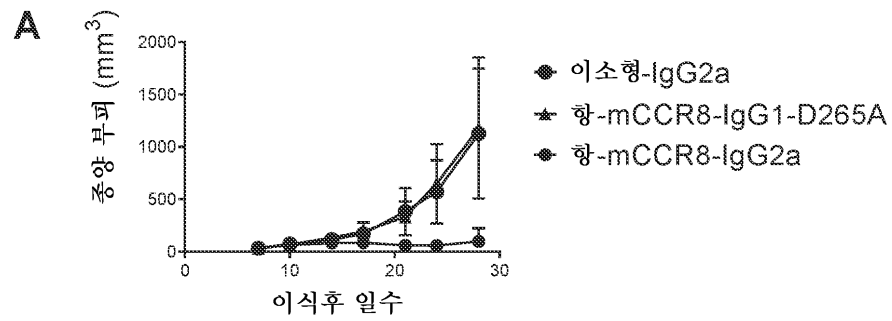
도면27

도 27A 및 27B



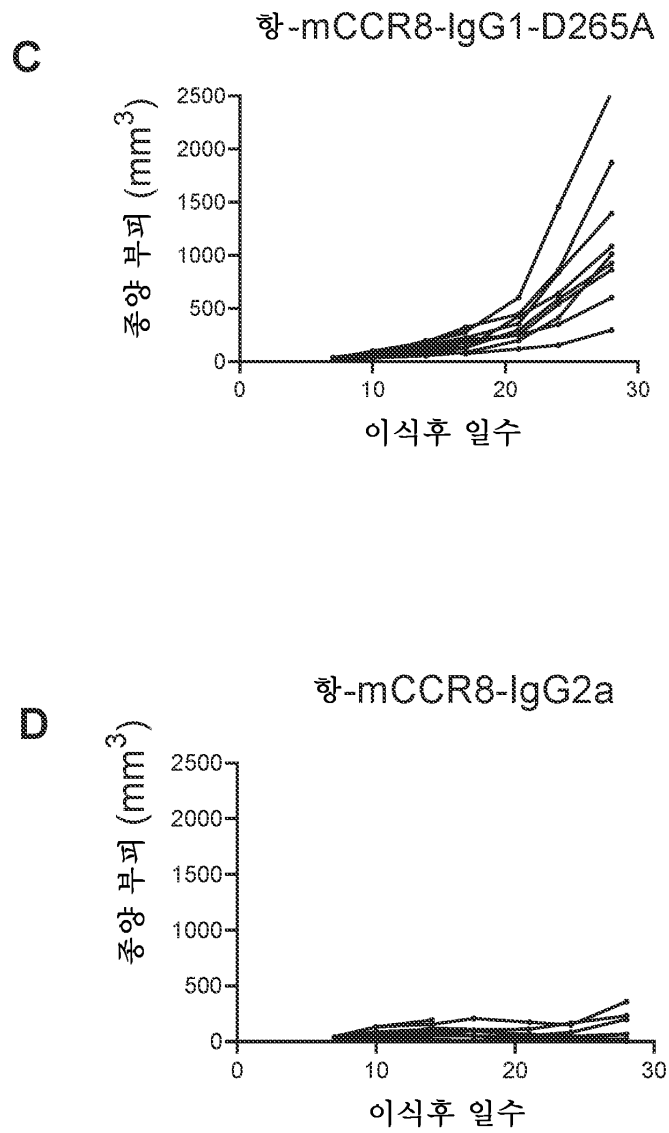
도면28i

도 28A 및 28B



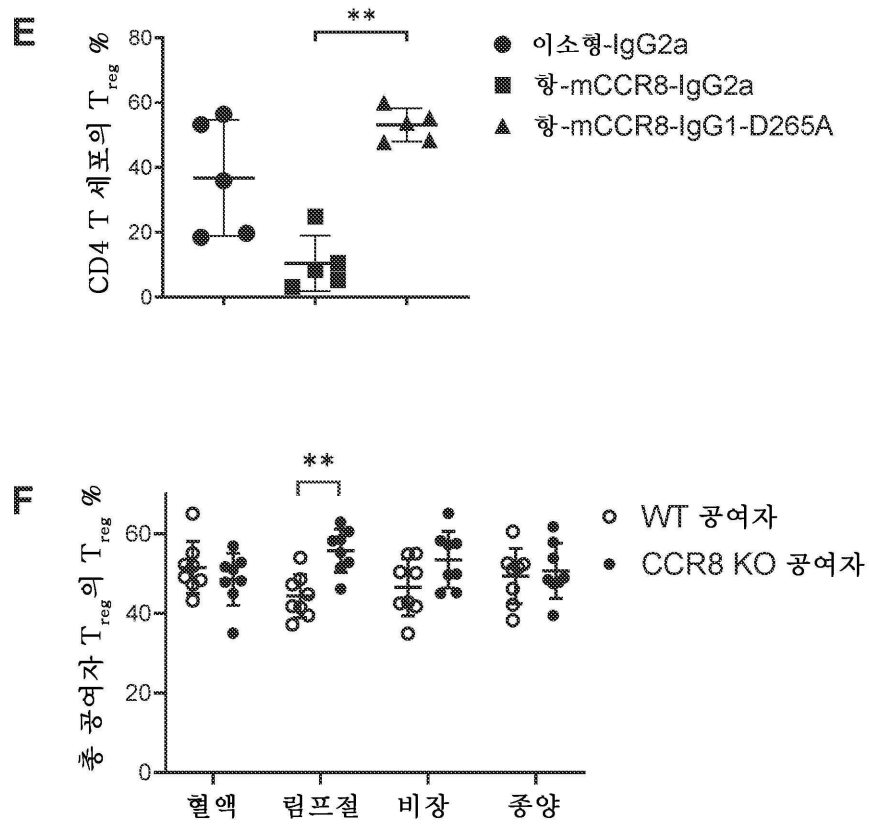
도면28ii

도 28C 및 28D



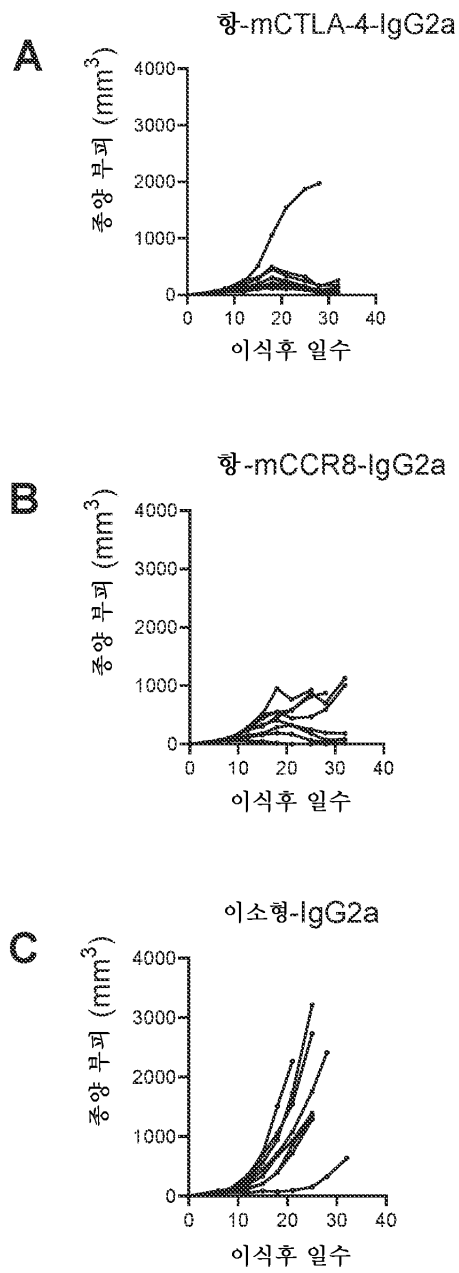
도면28iii

도 28E 및 28F

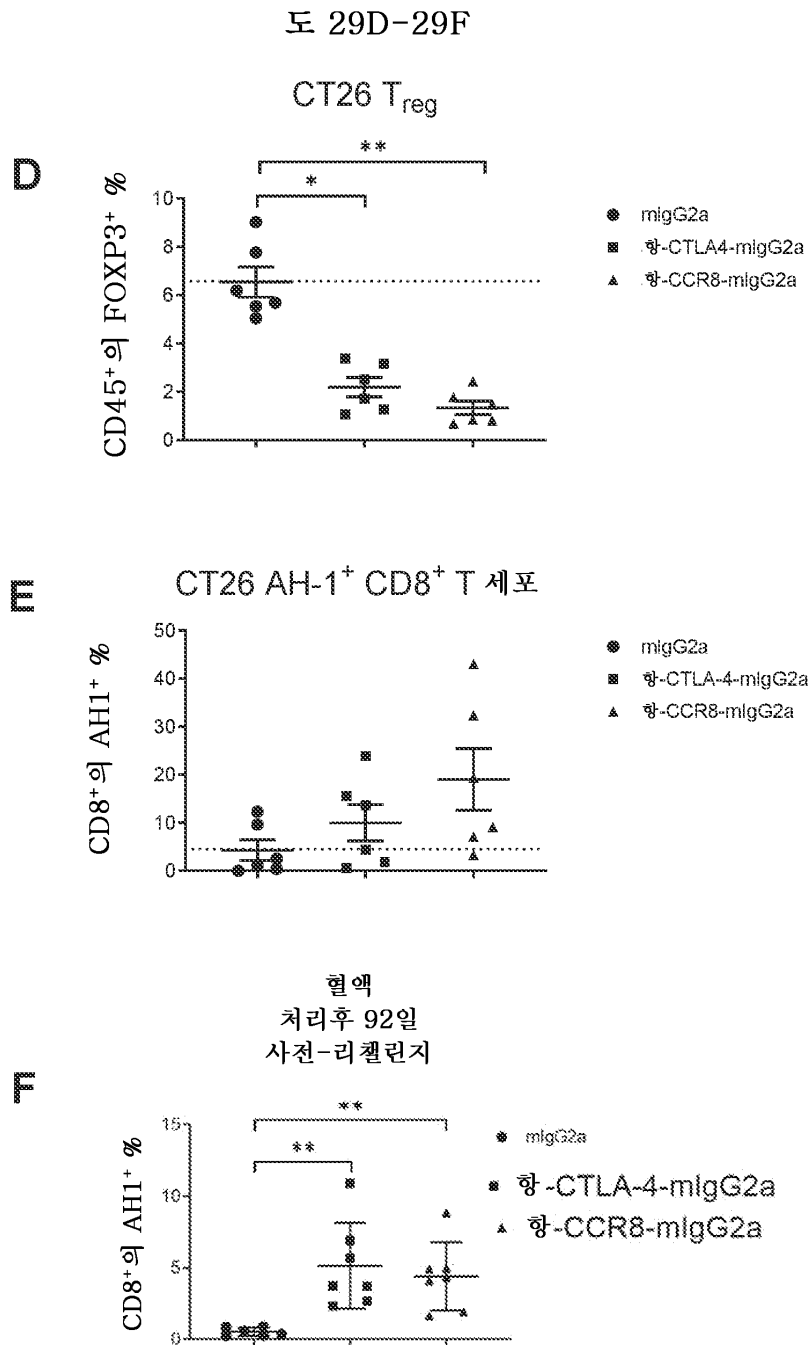


도면29i

도 29A-29C

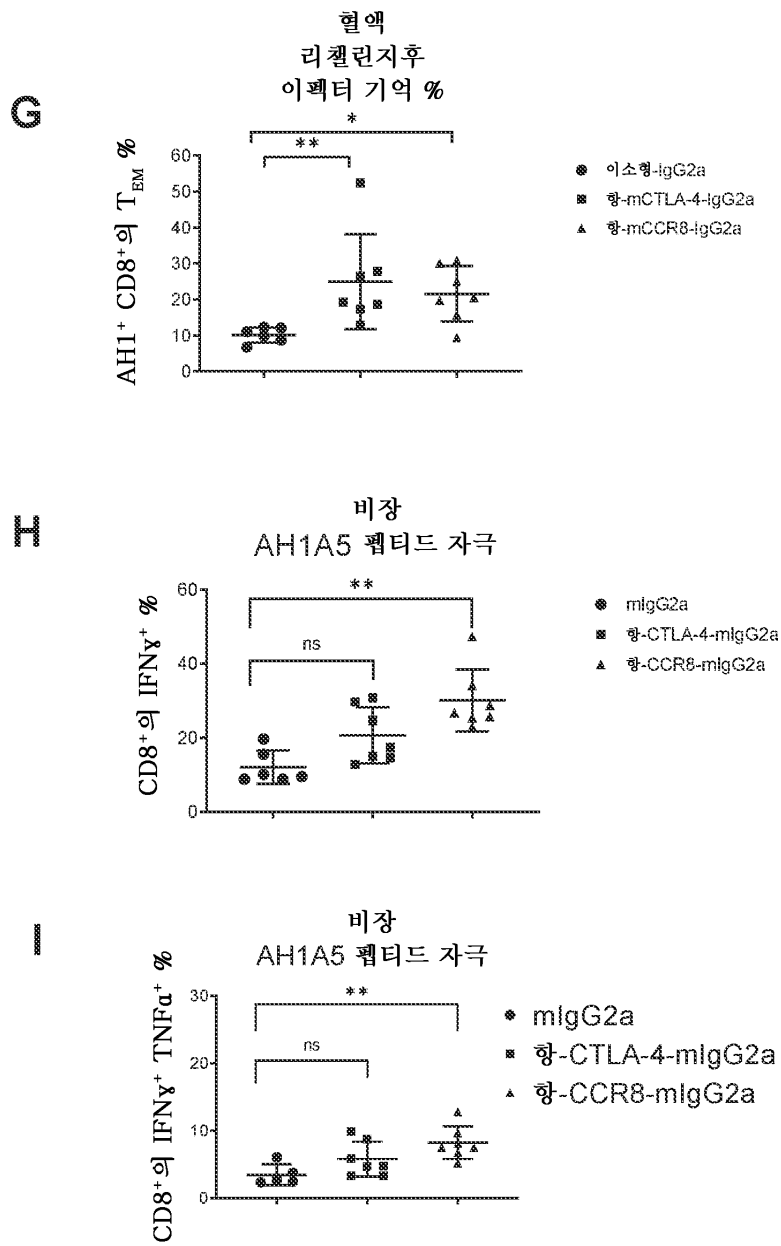


도면29ii



도면29iii

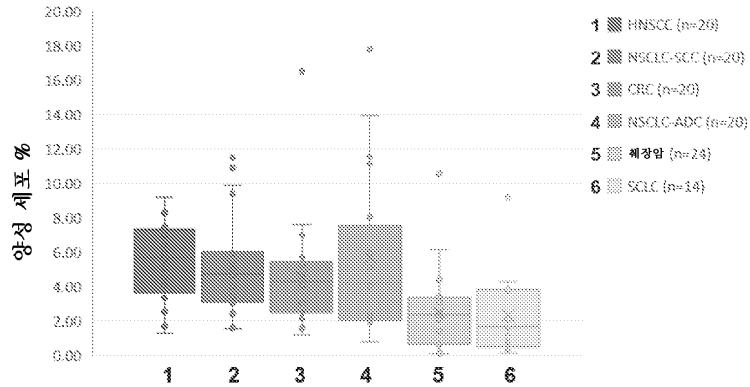
도 29G-29I



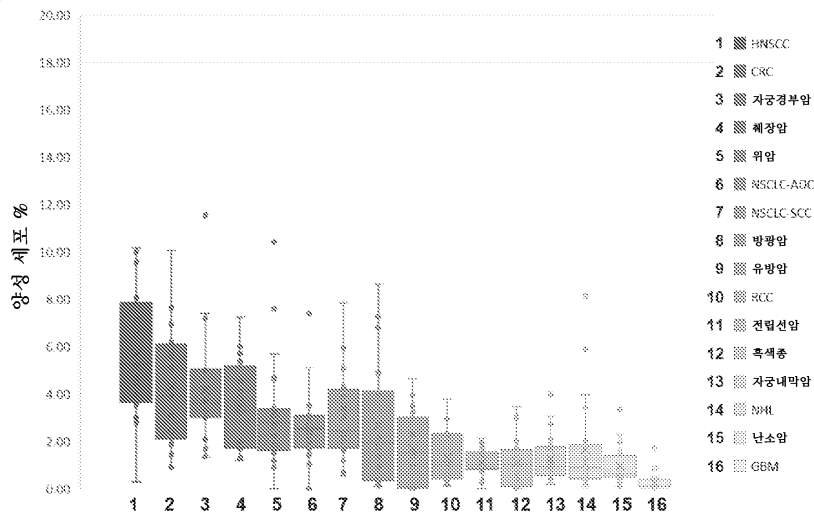
도면30

도 30A 및 30B

A



B



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Bristol Myers Squibb

<120> ANTI-CCR8 ANTIBODIES FOR TREATING CANCER

<130> 13358-WO-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> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 2

Tyr Tyr Tyr Pro Asp Ile Phe

1 5

<210> 3

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Thr Thr Ile Ala His Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Val Arg Arg Leu Lys Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Phe Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Arg Phe Asn Pro Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Lys Met

65 70 75 80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Val Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Gly Tyr Ser Asp Leu Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Val Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Gly Leu Arg Arg Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 6

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 16

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

His Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 17

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Arg Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Ser Gly Tyr Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser
20 25 30
Ser Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65						70						75						80		
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ser					
					85					90					95					
Thr	His	Val	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
					100					105					110					
<210>	19																			
<211>	107																			
<212>	PRT																			
<213>	Homo Sapien																			
<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>	Homo Sapien																			
<400>	20																			
Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly					
1						5						10						15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Arg	Trp					

20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro

85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 22

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser His

20 25 30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Thr

65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Ser Tyr Ser Leu Pro Leu

85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 23

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 24

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Arg Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Thr

20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85 90 95

Thr Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105 110

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 27

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Asn Met Asn

1 5 10

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 29

Arg Leu Lys Gly Ser Phe Asp Tyr

1 5

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 31

Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 32

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 33

Gly Phe Arg Phe Asn Pro Tyr Ala Met Asn

1 5 10

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 35

Tyr Ser Asp Leu Tyr Val Leu Asp Tyr

1 5

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 37

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 38

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 39

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His

1 5 10

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 41

Leu Arg Arg Phe Val Tyr

1 5

<210> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 43

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 44

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 45

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser Glu Met His

1 5 10

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 47

Arg Arg Arg Asn Phe Asp Tyr

1 5

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 49

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 50

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 51

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Asn Met Ile

1 5 10

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 53

Arg Leu Gly Val Phe Asp Tyr

1 5

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 54

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 55

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 56

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 57

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Asn

1 5 10

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 59

Arg Gln Gly Val Phe Asp Ile

1 5

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 60

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 61

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 62

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 63

Gly Phe Thr Phe Ser Val Ala Trp Met His

1 5 10

<210> 64

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 65

Val Thr Met Val Arg Gly Val Leu Tyr Asp Phe

1 5 10

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 66

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 67

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 68

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Arg Thr

1 5

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 69

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His

1 5 10

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 71

Val Pro Asn Trp Arg Gly Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 72

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 72

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser His Leu His

1 5 10

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 73

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser

1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 74

His Gln Ser Tyr Ser Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 75

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Asn Met Ile

1 5 10

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 77

Arg Trp Lys Gly Val Phe Asp Tyr

1 5

<210> 78

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 78

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 79

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 80

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 81

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met His

1 5 10

<210> 82

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 83

Arg Gly Glu Leu Gly Ile Gly Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 84

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 85

Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 86

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 87

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn Asn Met Ile

1 5 10

<210> 88

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 88

Tyr Ile 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> Homo Sapien

<400> 89

Arg Trp Arg Gly Val Phe Asp Tyr

1 5

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400>

> 90

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 91

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 92

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 93

Gly Phe Ser Phe Arg Ser Tyr Gly Ile His

1 5 10

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 95

Gly Arg Arg Pro Ser Gly Glu Gly Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 96

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 97

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 97

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 98

Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro Thr

1 5

<210> 99

<211> 447

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 99

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Thr Thr Ile Ala His Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
 Val Arg Arg Leu Lys Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 100
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 <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> Homo Sapien

<400> 101

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65						70						75						80	
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Val	Val	Tyr	Tyr	Cys				
					85					90					95				
Thr	Gly	Leu	Arg	Arg	Phe	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Pro	Val	Thr				
					100					105					110				
Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro				
					115					120					125				
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val				
					130					135					140				
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala				
145					150					155					160				
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly				
					165					170					175				
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly				
					180					185					190				
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys				
195					200					205									
Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys				
210					215					220									
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu				
225					230					235					240				
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu				
					245					250					255				
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys				
260					265					270									
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys				
275					280					285									
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu				
290					295					300									
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys				
305					310					315					320				

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 102

<211> 445

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 103

Gly Phe Arg Phe Gly Pro Tyr Ala Met Asn

1 5 10

<210> 104

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 105

Tyr Ser Asp Leu Tyr Val Leu Asp Tyr

1 5

<210> 106

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<400> 107

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 108

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 109

<211> 11

<212

> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 109

Val Thr Asp Tyr Tyr Tyr Pro Asp Ile Phe Ser

1 5 10

<210> 110

<211> 451

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<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> Homo Sapien

<

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> Homo Sapien
 <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> Homo Sapien
 <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> Homo Sapien
 <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> Homo Sapien
 <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> Homo Sapien

<400> 117

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Phe Gly Pro Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Gly Tyr Ser Asp Leu Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly

<210> 118

<211> 219

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 118

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Pro Ser Leu Pro Val Asn Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Gln Gly Asn Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Trp Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 119

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 119

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 120
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 <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