



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0046533  
(43) 공개일자 2024년04월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/566 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/2866 (2013.01)  
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7007534
- (22) 출원일자(국제) 2022년08월19일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년03월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2022/113739
- (87) 국제공개번호 WO 2023/020621  
국제공개일자 2023년02월23일
- (30) 우선권주장  
PCT/CN2021/113913 2021년08월20일 중국(CN)

- (71) 출원인  
하이파이바이오 인코퍼레이티드  
미국 메사추세츠 02139 캠프릿지 퍼트넘 애비뉴 237
- (72) 발명자  
프리젠트 줄리  
프랑스 94700 메종 알포르 콰이 페르낭 사계 36  
벨트라미넬리 니콜라 아르투로 알도  
프랑스 69100 빌뢰르반 튀 밀론 6  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인와이에스장

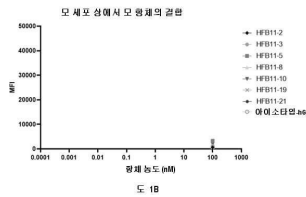
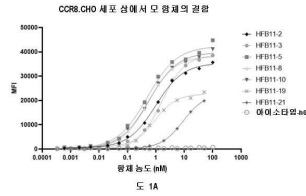
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 항-CCR8 항체 및 그것의 용도

(57) 요약

항-CCR8 항체 및 그것의 항원 결합 단편이 본원에서 기술된다. 또한 항-CCR8 항체 및 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산, 항-CCR8 항체 및 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물, 및 필요로 하는 대상체에서 암을 치료 또는 예방하기 위하여 항-CCR8 항체 및 그것의 항원 결합 단편을 제조 및 사용하는 방법이 본원에서 기술된다.

대표도 - 도1ac



	HF811-2	HF811-3	HF811-5	HF811-8	HF811-10	HF811-19	HF811-21
EC50 (nM)	0.98	1.63	0.49	0.53	0.57	0.86	9.05

도 1c

(52) CPC특허분류

**G01N 33/566** (2013.01)  
*A61K 2039/505* (2013.01)  
*C07K 2317/24* (2013.01)  
*C07K 2317/33* (2013.01)  
*C07K 2317/732* (2013.01)  
*C07K 2317/76* (2013.01)

(72) 발명자

**엘루즈 사미**

프랑스 92290 샤프네 말라브리 에비뉴 장 자우레스  
71

**아드리안 프란시스코**

미국 매사추세츠 02139 캠브릿지 퍼트넘 에비뉴  
237

**슈바이처 리앙**

미국 매사추세츠 02139 캠브릿지 퍼트넘 에비뉴  
237

**루 윤-유에**

중국 상하이 201203 푸둥 뉴 에이어 장형 로드  
1077

**폴턴 로스 베인**

미국 매사추세츠 01772 사우스버러 플래그 로드 42

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편으로서,

- (1) 각각 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 및 6;
- (2) 각각 서열 번호: 13, 2, 14, 4, 28, 및 6;
- (3) 각각 서열 번호: 13, 2, 15, 4, 5, 및 6;
- (4) 각각 서열 번호: 16, 17, 18, 29, 30, 및 6;
- (5) 각각 서열 번호: 19, 20, 21, 4, 5, 및 6;
- (6) 각각 서열 번호: 22, 23, 24, 31, 5, 및 32; 또는
- (7) 각각 서열 번호: 25, 26, 27, 33, 34, 및 35

의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2, HCDR3, 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2, 및 LCDR3을 포함하고,

항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 케모카인(C-C 모티프) 수용체 8(CCR8), 바람직하게는 인간 CCR8에 특이적으로 결합하는, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 서열 번호:7, 36, 38, 40, 42, 44, 또는 46에 대해 적어도 95% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 서열 번호:8, 37, 39, 41, 43, 45, 또는 47에 대해 적어도 95% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

- (1) 서열 번호:7의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:8의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- (2) 서열 번호:36의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:37의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- (3) 서열 번호:38의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:39의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- (4) 서열 번호:40의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:41의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- (5) 서열 번호:42의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:43의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- (6) 서열 번호:44의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:45의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는
- (7) 서열 번호:46의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:47의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 키메라 및/또는 인간 또는 인간화된 것을 특징으로 하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은:

- (1) 각각 서열 번호: 1, 48, 49, 50, 51, 및 6;
- (2) 각각 서열 번호: 1, 2, 49, 4, 5, 및 6;
- (3) 각각 서열 번호: 1, 2, 49, 50, 51, 및 6;
- (4) 각각 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 및 6; 또는
- (5) 각각 서열 번호: 1, 48, 49, 50, 51, 및 6

의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2, HCDR3, 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:9, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 또는 60에 대해 적어도 95% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 서열 번호:10, 61, 62, 또는 63에 대해 적어도 95% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은:

- (1) 서열 번호:9의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- (2) 서열 번호:52의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:63의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- (3) 서열 번호:52의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- (4) 서열 번호:53의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- (5) 서열 번호:54의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:63의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는
- (6) 서열 번호:59의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:62의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 항체 의존성 세포의 세포독성 (ADCC); 항체 의존성 세포의 식세포작용(ADCP)을 통해 이펙터 매개 종양 세포 용해를 유도할 수 있고/거나; 콘쥬게이션된 약물의 모집을 매개할 수 있고/거나; 암 사멸 효과를 가진 또 다른 mAb 또는 그것의 항원 결합 단편과 이중특이적 항체를 형성할 수 있는 것을 특징으로 하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 시노물구스 CCR8에 특

이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편.

**청구항 11**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 분리된 핵산.

**청구항 12**

제10항의 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 분리된 핵산.

**청구항 13**

제11항 또는 제12항의 분리된 핵산을 포함하는 벡터.

**청구항 14**

제13항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

**청구항 15**

제약학적 조성물로서, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 제9항의 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 및 제약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 제약학적 조성물.

**청구항 16**

대상체에게 제15항의 제약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 필요로 하는 대상체에서 암세포 표면에서 CCR8을 표적화하고/거나, 암을 치료하는 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 암은 고형 종양, 바람직하게는 침윤하는 T 세포를 가진 고형 종양, 보다 바람직하게는 침윤하는 Treg 세포를 가진 고형 종양, 보다 바람직하게는 CCR8을 발현하는 고도 억제성 Treg 세포를 가진 고형 종양, 가장 바람직하게는 그것에 대하여 자연 살해(NK) 세포 침윤이 발생한 CCR8을 과다발현하는 침윤하는 고도 억제성 Treg 세포를 가진 고형 종양인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

제16항 또는 제17항에 있어서, 암은 폐암, 두경부암, 식도암, 위암, 대장암, 유방암, 췌장암, 난소암, 신장암, 및 흑색종으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 CCR8 발현 Treg 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 제10항의 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편의 제조 방법으로서, 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산을 포함하는 세포를 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 생성하는 조건 하에서 배양하는 단계 및 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 세포 또는 배양으로부터 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 21**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 제10항의 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 제약학적 조성물의 제조 방법으로서, 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 제약학적으로 허용 가능한 담체와 조합하여 제약학적 조성물을 얻는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 22**

대상체에서 CCR8의 수준을 결정하는 방법으로서, 방법은:

- a. 대상체로부터 샘플을 얻는 단계;
- b. 샘플을 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계; 및
- c. 대상체에서 CCR8의 수준을 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 샘플은 조직 샘플 또는 혈액 샘플이고, 선택적으로 조직 샘플은 암 조직 샘플인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 24**

제22항에 있어서, 샘플은 Treg 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 현재 철회된, 2021년 8월 20일에 출원된 국제 특허 출원 번호 PCT/CN2021/113913에 대한 35 U.S.C. § 119(e)에 따르는 우선권의 이익을 주장한다. 선행 출원의 내용은 전체 내용이 본원의 부분으로 간주되며 본 출원의 개시에서 참조로 본원에 포함된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 발명은 분리된 항-케모카인(C-C 모티프) 수용체 8(CCR8) 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 항체를 암호화하는 핵산 및 발현 벡터, 벡터를 함유하는 재조합 세포, 및 항체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 항체의 제조 방법, 및 암 및/또는 관련된 합병증을 포함한 질환을 치료하기 위하여 항체를 사용하는 방법이 또한 제공된다.

[0005] **전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조**

[0006] 본 출원은 2021년 8월 6일에 생성되고 49 kb의 크기를 가지며 파일명 "065798.6W01 Sequence Listing"으로 ASCII 포맷 서열 목록으로서 EFS-Web을 통해 전자적으로 제출된 서열 목록을 함유한다. EFS-Web을 통해 제출된 서열 목록은 명세서의 일부분이며 전체 내용이 참조로 본원에 포함된다.

**배경 기술**

[0007] CCR8은 CCL1 또는 CCL8 구배 하에서 세포 이동을 매개하는 케모카인 수용체이다(Islam et al., JEM 210(10):1889-1898 (2013)). 최근에, CCR8은 순환계의 Treg와 비교하여 종양 내에 거주하면서 상당히 더 높게 발현되고 다른 T 세포 집단에서는 발현되지 않거나 매우 낮게 발현되는(각각 세포독성 T 세포 또는 이펙터 T 세포) Treg을 가진 인간 암에서 종양 침윤 조절 T 세포(TITR)의 고도로 특이적인 세포 표면 마커로서 확인되었다. 나아가, CCR8은 FoxP3high, CD25high, TIGIT+, LAG3+를 발현하고 높은 IL-10 및 TGF-β를 방출하는 높은 면역억제성 Treg 상에서 우세하게 발현된다. CCR8+Treg을 고갈시키면 면역억제성 사이토카인이 감소되고 전종양성 미세환경이 항종양 면역을 복원시키는 쪽으로 조절된다. 흥미롭게도, 유방암(유방암) 또는 전립선암(췌장암) 환

자에서, 높은 CCR8+ Treg 수는 질환의 더 진행된 단계 및 전체 생존율의 감소 가능성과 상관이 있었다. 그러므로, CCR8은 CCR8 양성 암을 치료하고 잠재적으로 치유하기 위한 암 면역요법에 대한 이상적인 표적이다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 한 일반적인 측면으로, 발명은 케모카인(C-C 모티프) 수용체 8(CCR8)에 특이적으로 결합하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0009] 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이 제공되며, 그것은:

[0010] (1) 각각 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 및 6;

[0011] (2) 각각 서열 번호: 13, 2, 14, 4, 28, 및 6;

[0012] (3) 각각 서열 번호: 13, 2, 15, 4, 5, 및 6;

[0013] (4) 각각 서열 번호: 16, 17, 18, 29, 30, 및 6;

[0014] (5) 각각 서열 번호: 19, 20, 21, 4, 5, 및 6;

[0015] (6) 각각 서열 번호: 22, 23, 24, 31, 5, 및 32; 또는

[0016] (7) 각각 서열 번호: 25, 26, 27, 33, 34, 및 35

[0017] 의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2, HCDR3, 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2, 및 LCDR3을 포함하고,

[0018] 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 케모카인(C-C 모티프) 수용체 8(CCR8), 바람직하게는 인간 CCR8에 특이적으로 결합한다.

[0019] 특정 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:7, 36, 38, 40, 42, 44, 또는 46에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 서열 번호:8, 37, 39, 41, 43, 45, 또는 47에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0020] 특정 구체예에서, 분리된 항-CCR8 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은:

[0021] (1) 서열 번호:7의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:8의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

[0022] (2) 서열 번호:36의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:37의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

[0023] (3) 서열 번호:38의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:39의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

[0024] (4) 서열 번호:40의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:41의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

[0025] (5) 서열 번호:42의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:43의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

[0026] (6) 서열 번호:44의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:45의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는

[0027] (7) 서열 번호:46의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:47의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역

- [0028] 을 포함한다.
- [0029] 특정 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 CCR8에 결합하고 항체 의존성 세포의 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포의 식세포작용(ADCP)을 통해 이펙터 매개 종양 세포 용해를 유도할 수 있고/거나, 콘주게이션된 약물의 활성을 매개할 수 있고/거나; 암 사멸 효과를 가진 또 다른 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편과 이중특이적 항체를 형성할 수 있다.
- [0030] 특정 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 키메릭 또는 인간 또는 인간화된 것이다.
- [0031] 특정 구체예에서, 인간화된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은:
- [0032] (1) 각각 서열 번호: 1, 48, 49, 50, 51, 및 6;
- [0033] (2) 각각 서열 번호: 1, 2, 49, 4, 5, 및 6;
- [0034] (3) 각각 서열 번호: 1, 2, 49, 50, 51, 및 6;
- [0035] (4) 각각 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 및 6; 또는
- [0036] (5) 각각 서열 번호: 1, 48, 49, 50, 51, 및 6
- [0037] 의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2, HCDR3, 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다.
- [0038] 특정 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:9, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 또는 60에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 서열 번호:10, 61, 62, 또는 63에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0039] 특정 구체예에서, 분리된 항-CCR8 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은:
- [0040] (1) 서열 번호:9의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- [0041] (2) 서열 번호:52의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:63의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- [0042] (3) 서열 번호:52의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- [0043] (4) 서열 번호:53의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- [0044] (5) 서열 번호:54의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:63의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0045] (6) 서열 번호:59의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:62의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0046] 특정 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 시노몰구스 CCR8에 특이적으로 결합한다.
- [0047] 또한 발명의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 분리된 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이 제공된다.
- [0048] 또한 발명의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 분리된 핵산이 제공된다.
- [0049] 또한 발명의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 분리된 핵산을 포함하는 벡터가 제공된다.

- [0050] 또한 발명의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 분리된 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0051] 특정 구체예에서, 발명의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 분리된 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 및 제약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 제약학적 조성물이 제공된다.
- [0052] 또한 발명의 제약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 그것을 필요로 하는 대상체에서 암 세포상의 C-C 모터프 케모카인 수용체 8(CCR8)을 특이적으로 표적화하는 방법이 제공된다.
- [0053] 또한 발명의 제약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 그것을 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 암은, 예를 들어, 고형 종양, 바람직하게는 침윤하는 T 세포를 가진 고형 종양, 보다 바람직하게는 침윤하는 T reg 세포를 가진 고형 종양, 보다 바람직하게는 CCR8을 발현하는 고도 억제성 T reg 세포를 가진 고형 종양, 가장 바람직하게는 자연 살해(NK) 세포침윤이 발생하게 되는 CCR8을 과다발현하는 침윤하는 고도 억제성 T reg 세포를 가진 고형 종양일 수 있다. 암의 예는, 예를 들어, 한정하는 것은 아니지만, 폐암(lung cancer), 두경부암(head and neck cancer), 식도암(esophageal cancer), 위암(stomach cancer), 대장암(colorectal cancer), 유방암(breast cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 난소암(ovarian cancer), 방광암(bladder cancer), 간암(liver cancer), 신장암(kidney cancer), 및 흑색종(melanoma)으로부터 선택될 수 있다. 특정 구체예에서, 대상체는 CCR8 발현 Treg 세포를 포함할 수 있다.
- [0054] 또한 발명의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 생성하는 방법이 제공된다. 방법은 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 생성하는 조건 하에서 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 단계, 및 세포 또는 배양으로부터 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함한다.
- [0055] 또한 발명의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 제약학적 조성물을 제조하는 방법이 제공된다. 방법은 제약학적 조성물을 얻기 위해 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 제약학적으로 허용 가능한 담체와 조합시키는 단계를 포함한다.
- [0056] 또한 대상체에서 CCR8의 수준을 결정하는 방법이 제공된다. 방법은 (a) 대상체로부터 샘플을 얻는 단계; (b) 샘플을 발명의 항-CCR8 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계; 및 (c) 대상체에서 CCR8의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 샘플은 조직 샘플이다. 조직 샘플은, 예를 들어, 암 조직 샘플일 수 있다. 특정 구체예에서, 샘플은 혈액 샘플이다. 특정 구체예에서, 샘플은 Treg 세포를 포함한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0057] 전술한 요약, 뿐만 아니라 다음의 본 발명의 바람직한 구체예의 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 그러나, 출원은 도면에 도시된 정확한 구체예에 제한되지 않는 것이 이해되어야 한다.
- 도 1A-1C**는 항-CCR8 단클론성 항체가 CCR8 발현 세포에 nM 미만의 EC<sub>50</sub>으로 특이적으로 결합하는 것을 도시한다.
- 도 1A**는 CCR8.CHO 세포에서 모(parental) 항체의 결합을 도시한다. **도 1B**는 모 세포에서 모 항체의 결합을 도시한다. **도 1C**는 도 1A 및 1B에서 측정된 EC<sub>50</sub>을 요약한 표이다.
- 도 2**는 항-CCR8 단클론성 항체가 N 말단 에피토프뿐만 아니라 단백질 형성에 관여하는 hCCR8 루프 1을 인식하며, hCCR4를 인식하지 않는 것을 도시한다. 상단: 키메라 구성물의 도면(검은색: hCCR8, 회색: hCCR4); 하단: 구성물과 관련된 프로파일.
- 도 3A-3C**는 항-CCR8 단클론성 항체가 인간 CCR8 단백질에 결합하며 마우스 및/또는 시노물구스 CCR8 단백질과도 교차 반응할 수 있는 것을 도시한다. **도 3A**는 인간, 마우스 및 시노물구스 CCR8 단백질에 결합하는 항-CCR8 단클론성 항체를 도시한다. **도 3B**는 HFB11-21 및 HFB11-19의 EC<sub>50</sub>을 도시한다. **도 3C**는 HFB11-21 및 HFB11-2의 EC<sub>50</sub>을 도시한다.
- 도 4A-4B**는 항-CCR8 단클론성 항체에 대한 상이한 CCL1 차단 프로파일(**도 4A**) AC 관련된 IC<sub>50</sub> 표(**도 4B**)를 도시한다. cyno-교차 반응성 항체는 hCCL1을 차단하지 않고, 오히려 강력한 hCCR8 억제 항체가 hCCL1을 차단한다.

**도 5A-5G**는 항-CCR8 단클론성 항체가 세포내  $Ca^{2+}$  플럭스를 억제하는 것을 도시한다. **도 5A**는 완충제 존재 하의  $Ca^{2+}$  변화를 도시한다. **도 5B**는 1 nM CCL1의 존재 하의  $Ca^{2+}$  변화를 도시한다. **도 5C**는 1 nM CCL1 + HFB11-3의 존재 하의  $Ca^{2+}$  변화를 도시한다. **도 5D**는 1 nM CCL1 + HFB11-10의 존재 하의  $Ca^{2+}$  변화를 도시한다. **도 5E**는 완충제 + 10 nM CCL1의 존재 하의  $Ca^{2+}$  변화를 도시한다. **도 5F**는 10 nM CCL1 + HFB11-3의 존재 하의  $Ca^{2+}$  변화를 도시한다. **도 5G**는 10 nM CCL1 + HFB11-10의 존재 하의  $Ca^{2+}$  변화를 도시한다.

**도 6A-6B**는 항-CCR8 항체가 ADCC 리포터 생물검정에서 CD16과 강력하게 맞물리고 CD16 조작 세포를 통해 ADCC를 매개하는 것을 도시한다. **도 6A**는 루시페라제 기질과 5분 동안 인큐베이션한 후 RLU 신호를 도시한다. **도 6B**는 모든 항체에 대한  $EC_{50}$  및  $E_{max}$  값의 표를 도시한다.

**도 7A-7B**는 ADCC 향상된 포맷의 인간화된 항-CCR8 항체가 CCR8 발현 세포에 특이적으로 결합하는 것을 도시한다. **도 7A**는 MFI 신호를 도시한다. **도 7B**는 모든 항체에 대한  $EC_{50}$  값의 표를 도시한다.

**도 8A-8B**는 인간화된 항-CCR8 항체가 CCR8 발현 세포에 대한 결합을 차단하는 것을 도시한다. **도 8A**는 CCL1 차단 퍼센트를 도시한다. **도 8B**는 모든 항체에 대한  $IC_{50}$  값의 표를 도시한다.

**도 9**는 인간화된 HFB11-10Hz37 항-CCR8 항체가 ADCC 리포터 생물검정에서 CD16 F 및 V 변이체 둘 다와 맞물리는 것을 도시한다.

**도 10A-10B**는 인간화된 항-CCR8 항체가 CCR8 발현 세포 상에서 ADCC를 매개하는 것을 도시한다. **도 10A**는 비유해 퍼센트를 도시한다. **도 10B**는 모든 항체에 대한  $EC_{50}$  값의 표를 도시한다.

**11A-11G**는 항-CCR8 mAb HFB101110의 시험관내 특성화를 도시한다. **도 11A**는 유세포 분석에 의해 측정된 바 HFB101110의 높은 복사수(CHOK1-hCCR8, 약 30,000 수용체/세포, 좌측) 또는 낮은 복사수(M300.19-hCCR8, 약 2,000 수용체/세포, 우측) 세포에 대한 결합을 도시한다. **도 11B**는 M300.19-hCCR8 세포에 대한 HFB101110의 ADCC 활성을 도시한다. **도 11C**는 관련된 케모카인 수용체 CCR4에 대한 HFB101110의 결합이 유세포 분석에 의해 평가된 것을 도시한다. **도 11D**는 HFB101110에 의해 인식된 CCR8의 영역을 확인하기 위한 도메인 교환 실험을 도시한다. **도 11E**는 유세포 분석에 의해 측정된, HFB101110에 의한 hCCL1의 hCCR8에 대한 결합의 차단을 도시한다. **도 11F**는 트랜스웰 이동 분석에 의해 측정된, 재조합 hCCL1에 의해 유도된 CR8+ 세포의 화학주성의 HFB101110 매개 차단을 도시한다. **도 11G**는 hCCL1의 CCR8+ 세포에의 첨가에 의해 유도된 칼슘 플럭스의 HFB101110 매개 차단을 도시한다.

**도 12**는 인간화된 HFB11-10Hz37 항-CCR8 항체가 CCR8+ 발현 세포의 ADCP를 매개하는 것을 도시한다.

**도 13A-13C**는 hCCR8-KI 마우스에서 MC38 세포에 대한 항종양 활성을 매개하는 것을 도시한다. **도 13A**는 MG053 아이소타입으로의 치료 후 종양 부피를 도시한다. **도 13B**는 Hz 변이체로의 치료 후 종양 부피를 도시한다. **도 13C**는 MG053 아이소타입 또는 Hz 변이체로의 치료 후 종양 부피의 비교를 도시한다.

**도 14A-14F**는 인간화된 항-CCR8 항체 요법이 생체내에서 종양 미세환경을 재프로그래밍하는 것을 도시한다. **도 14A**는 아이소타입 또는 HFB11-10Hz37로의 치료 후 CD4+ 중의 Treg 퍼센트를 도시한다. **도 14B**는 아이소타입 또는 HFB11-10Hz37로의 치료 후 CD4+ 중의 CD4+ T 이펙터 퍼센트를 도시한다. **도 14C**는 아이소타입 또는 HFB11-10Hz37로의 치료 후 CD3+ 중의 CD8+ 퍼센트를 도시한다. **도 14D**는 아이소타입 또는 HFB11-10Hz37로의 치료 후 CD8+/Treg 비율을 도시한다. **도 14E**는 아이소타입 또는 HFB11-10Hz37로의 치료 후 CD45+ 중의 자연 살해자 퍼센트를 도시한다. **도 14F**는 아이소타입 또는 HFB11-10Hz37로의 치료 후 Treg 중의 CDR8+ 퍼센트를 도시한다.

**도 15A-15B**는 신장 세포암(RCC) 환자 및 폐암 환자로부터의 인간 원발성 종양으로부터의 T 세포 집단에서의 CCR8 발현을 도시한다. 각각의 점은 개별 환자로부터의 데이터를 나타낸다(**도 15A**). **도 15B**는 RCC 환자의 TIL로부터의 CD8+(CD8+ CD3+), Tef(FoxP3- CD4+ CD3+), 및 Treg(FoxP3+ CD4+ CD3+)에서 CCR8 발현을 오버레이하는 히스토그램을 도시한다.

**도 16**는 건강한 PBMC 및 악성 PBMC에서 순환으로부터의 T 세포 집단에서의 CCR8 발현을 도시한다.

**도 17A-17E**는 RCC 환자(n=13명)로부터의 일차 인간 TIL에서 인간화된 HFB11-10 항체에 의해 매개된 생체의 ADCC 활성을 도시한다. **도 17A**는 샘플 수집 및 ADCC 검정을 개략적으로 도시한다. **도 17B**는 상이한 T 세포 하위세트의 고갈을 도시한다. 각각의 점은 개별 환자로부터의 데이터를 나타낸다. **도 17C**는 대표적인 RCC 환자로부터의

TIL에서 50 nM의 HFB11-10 Hz 항체로 처리된 그룹 대비 아이소타입 그룹으로부터 CD3+ CD4+ Foxp3+ TIGIT+ 세포로서 게이팅된 Treg 집단을 보여주는 도트 플롯을 도시한다. 도 17D는 HFB101110의 Treg 고갈 활성의 용량 반응을 도시한다. 도 17E는 첨가된 외인성 NK 세포의 양의 함수로서 ADCC 검정에서 Treg의 고갈을 도시한다.

도 18A-18C는 안전성 및 약동학 연구를 도시한다. 도 18A는 시노물구스 원숭이에서 단일 용량 PK 연구를 개략적으로 도시한다. 도 18B는 시노물구스 원숭이에서 HFB101110의 혈청 PK 프로파일을 도시한다. 도 18C는 가용성 항체 포맷을 사용하는 인간 PBMC로부터의 시험관내 사이토카인 방출 연구를 도시한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0058] 다양한 출판물, 논문 및 특허가 배경기술과 명세서 전반에 걸쳐 인용되거나 기재된다; 이들 참고문헌의 각각은 전체 내용이 참조로 본원에 포함된다. 본 명세서에 포함된 문서, 행위, 물질, 장치, 물품 등의 논의는 발명에 대한 맥락을 제공할 목적을 위한 것이다. 그러한 논의는 이들 물질 중 어느 것 또는 전부가 개시되거나 청구되는 임의의 발명과 관련하여 선행 기술의 일부를 형성하는 것을 인정하는 것이 아니다.
- [0059] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적이고 과학적인 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 그렇지 않으면, 본원에 사용된 특정 용어는 명세서에 제시된 의미를 가진다.
- [0060] 본원에서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바, 단수를 나타내는 용어는 수식하는 관사("a", "an", 및 "the")와 함께 맥락이 분명하게 다른 것을 표시하지 않는 한 복수의 대상을 포함한다.
- [0061] 달리 표시되지 않는 한, 본원에서 기술된 임의의 수치 값, 예컨대 농도 또는 농도 범위는 모든 경우에 용어 "약"으로 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 그러므로, 수치 값은 전형적으로 인용된 값의 ± 10%를 포함한다.
- [0062] 예를 들어, 1 mg/mL의 농도에는 0.9 mg/mL 내지 1.1 mg/mL이 포함된다. 마찬가지로, 1% 내지 10%(중량/부피)의 농도 범위에는 0.9%(중량/부피) 내지 11%(중량/부피)가 포함된다. 본원에서 사용되는 바, 수치 범위의 사용에는 맥락이 분명하게 달리 나타나지 않는 한 모든 가능한 하위범위, 그러한 범위 내의 정수 및 값의 분수를 포함한 그 범위 내의 모든 개별적인 수치 값이 명백하게 포함된다.
- [0063] 달리 표시되지 않는 한, 일련의 요소에 선행하는 용어 "적어도"는 시리즈의 모든 요소를 언급하는 것으로 이해되어야 한다. 기술분야에 숙련된 사람이면 일상적인 실험만을 사용하여 본원에 기술된 발명의 구체적인 구체에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 그러한 등가물은 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0064] 본원에서 사용되는 바, 용어 "포함한다", "포함하는", "포함된다", "포함되는", "가진다", "가지는", "함유한다" 또는 "함유하는", 또는 이것들의 임의의 변용은 명시된 정수 또는 정수의 그룹을 포함하는 것을 함축하지만 임의의 다른 정수 또는 정수의 그룹을 배제하는 것이 아니며 배타적이지 않거나 개방적인 것으로 의도된 것이 이해될 것이다. 예를 들어, 요소의 목록을 포함하는 조성물, 혼합물, 과정, 방법, 물품, 또는 장치는 본질적으로 그 요소들에만 제한되지 않으며 그러한 조성물, 혼합물, 과정, 방법, 물품, 또는 장치에 대해 분명하게 열거되지 않거나 고유하지 않은 다른 요소가 포함될 수 있다. 추가로, 명백하게 반대로 표시되지 않는 한, "또는"은 배타적인 또는이 아닌 포괄적인 또는을 나타낸다. 예를 들어, 조건 A 또는 B는 다음 중 어느 하나에 의해 충족된다: A는 참(또는 존재)이고 B는 거짓(또는 존재하지 않음)이거나, A는 거짓(또는 존재하지 않음)이고 B는 참(또는 존재)이거나, A와 B는 둘 다 참(또는 존재)이다.
- [0065] 본원에서 사용되는 바, 다수의 인용된 요소 사이의 접속 용어 "및/또는"은 개별적이고 조합된 옵션 모두를 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 두 요소가 "및/또는"에 의해 결합되는 경우, 제1 옵션은 제2 요소 없이 제1 요소의 적용 가능성을 나타낸다. 제2 옵션은 제1 요소 없이 제2 요소의 적용 가능성을 나타낸다. 제3 옵션은 제1 및 제2 요소를 함께 적용하는 가능성을 나타낸다. 이들 옵션 중 어느 것이든 하나가 의미 내에 속하는 것으로 이해되며, 따라서 본원에서 사용된 용어 "및/또는"의 요구조건을 충족한다. 하나 이상의 옵션의 동시 적용 가능성도 또한 의미 내에 속하는 것으로 이해되며, 따라서 용어 "및/또는"의 요구조건을 충족한다.
- [0066] 본원에서 사용되는 바, 명세서 및 청구범위 전반에서 사용되는 바, 용어 "이루어지는", 또는 "이루어진다" 또는 "이루어지는"과 같은 변용은 임의의 인용된 정수 또는 정수의 그룹의 포함을 나타내지만, 명시된 방법, 구조, 또는 조성물에 추가적인 정수 또는 정수의 그룹이 첨가될 수 없는 것을 나타낸다.
- [0067] 본원에서 사용되는 바, 명세서 및 청구범위 전반에서 사용되는 바, 용어 "본질적으로 이루어지는", 또는 "본질적으로 이루어진다" 또는 "본질적으로 이루어지는"과 같은 변용은 임의의 인용된 정수 또는 정수의 그룹의

포함, 및 실질적으로 명시된 방법, 구조 또는 조성물의 기본적인거나 신규한 특성을 변경시키지 않는 임의의 인용된 정수 또는 정수의 그룹의 선택적인 포함을 나타낸다. M.P.E.P. § 2111.03을 참고한다.

- [0068] 본원에서 사용되는 바, "대상체"는 임의의 동물, 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 인간을 의미한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "포유류"는 임의의 포유류를 아우른다. 포유류의 예로는, 한정하는 것은 아니지만, 소, 말, 양, 돼지, 고양이, 개, 마우스, 래트, 토끼, 기니아 피그, 원숭이, 인간, 등, 보다 바람직하게는 인간을 들 수 있다.
- [0069] "우측", "좌측", "하부", 및 "상부"의 단어는 참조하는 도면에서의 방향을 나타낸다.
- [0070] 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람에 의해 이해되는 바, 숙련된 바람직한 발명의 구성요소의 치수 또는 특징을 언급할 때 본원에서 사용된 용어 "약", "대략적으로", "일반적으로", "실질적으로", 등의 용어는 기술된 치수/특징이 엄밀한 경계 또는 매개변수가 아니며 기능적으로 동일하거나 유사한 그것으로부터의 미미한 변화를 배제하지 않는 것을 나타내는 것이 또한 이해되어야 한다. 최소한, 수치 매개변수를 포함하는 그러한 참조는 기술분야에서 허용된 수학적이고 산업적인 원리(예컨대, 반올림, 측정 또는 다른 체계적 오류, 제조 허용오차, 등)를 사용하여, 유의한 최소 숫자를 변경시키지 않을 변화를 포함할 것이다.
- [0071] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열(예컨대, 항-CCR8 항체 및 그것을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, CCR8 폴리펩타이드 및 그것을 암호화하는 CCR8 폴리뉴클레오타이드)의 맥락에서, 용어 "동일한" 또는 퍼센트 "동일성"은, 다음의 서열 비교 알고리즘 중 하나를 사용하거나 육안 검사에 의해 측정되는 바, 비교하고 최대 상응성에 대해 정렬될 때 동일하거나 또는 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 명시된 백분율을 가지는 둘 이상의 서열 또는 하위서열을 지칭한다.
- [0072] 서열 비교를 위해, 전형적으로 한 서열은 테스트 서열이 비교되는 참조 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때, 테스트 및 참조 서열은 컴퓨터에 입력되고, 하위서열 좌표가 지정되며, 필요하다면, 서열 알고리즘 프로그램 매개변수가 지정된다. 그런 후 서열 비교 알고리즘이, 지정된 프로그램 매개변수를 기반으로 하여 참조 서열에 비교한 테스트 서열(들)에 대한 서열 동일성 퍼센트를 계산한다.
- [0073] 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 예컨대, 문헌[Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 1981; 2:482]의 국소 상동성 알고리즘에 의해, 문헌[Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 1970; 48:443]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌[Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 1988; 85:2444]의 유사성 방법 조사에 의해, 이들 알고리즘의 컴퓨터를 이용한 실행(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA)에 의해, 또는 육안 검사에 의해 수행될 수 있다(일반적으로, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., 1995 Supplement (Ausubel) 참고).
- [0074] 서열 동일성 및 서열 유사성 퍼센트를 결정하기에 적합한 알고리즘의 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘으로, 이것들은 문헌에 기재되어 있다[각각 Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990; 215: 403-410 및 Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997; 25: 3389-3402]. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생명공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 이용 가능하다. 이 알고리즘은 먼저 문제의 서열에서 길이 W의 짧은 단어를 확인함으로써 고득점 서열쌍(HSP)을 확인하는 것을 포함하며, 이것은 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어와 정렬될 때 일부 양수 한계값 점수 T와 일치하거나 충족시킨다. T는 인접 단어 점수 한계값으로서 언급된다(Altschul et al, 위와 같음). 이들 초기 인접 단어 히트는 그것을 함유하는 더 긴 HSP를 찾기 위해 조사를 개시하기 위한 시드(seed)로서 작용한다. 그런 후 단어 히트는 각각의 서열을 따라 누적 정렬 점수가 증가될 수 있는 한 양 방향으로 확장된다.
- [0075] 누적 점수는, 뉴클레오타이드 서열의 경우, 매개변수 M(매칭되는 잔기 쌍에 대한 보상 점수; 언제나 > 0) 및 N(매칭되는 잔기에 대한 페널티 점수; 언제나 < 0)을 사용하여 계산된다. 아미노산 잔기의 경우, 채점 매트릭스는 누적 점수를 계산하기 위해 사용된다. 각 방향에서 단어 히트의 연장은: 누적 정렬 점수가 최대 달성 값으로부터 X 양만큼 떨어질 때; 누적 점수가 하나 이상의 음수 채점 잔기 정렬의 축적으로 인해 0 이하가 될 때; 또는 어느 쪽이든 서열의 단부에 도달할 때 정지된다. BLAST 알고리즘 매개변수 W, T, 및 X는 정렬의 민감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램(뉴클레오타이드 서열의 경우)은 기본값으로서 11의 단어길이(W), 10의 기대값(E), M=5, N=-4, 및 양 가닥의 비교를 사용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 기본값으로서 3의 단어길이(W), 10의 기대값(E), 및 BLOSUM62 채점 매트릭스를 사용한다(Henikoff & Henikoff, Proc. Nat'l.

Acad. Sci. USA 1989; 89:10915 참고).

- [0076] 서열 동일성 퍼센트를 계산하는 것 외에, BLAST 알고리즘은 또한 두 서열간 유사성의 통계학적 분석을 수행한다 (예컨대, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 1993; 90:5873-5787 참고). BLAST 알고리즘에 의해 제공된 유사성의 한 척도는 최소 합 확률(P(N))로, 이것은 2개의 뉴클레오타이드 또는 핵산 서열 간 매치가 우연히 발생할 확률의 지표를 제공한다. 예를 들어, 핵산은 만약 테스트 핵산과 참조 핵산의 비교에서 최소 합 확률이 약 0.1 미만이면, 보다 바람직하게는 약 0.01 미만이면, 가장 바람직하게는 약 0.001 미만이면 참조 서열에 유사한 것으로 간주된다.
- [0077] 두 핵산 서열 또는 폴리펩타이드가 실질적으로 동일하다는 추가의 지표는, 아래에서 기술되는 것과 같이, 제 핵산에 의해 암호화된 폴리펩타이드가 제2 핵산에 의해 암호화된 폴리펩타이드와 면역학적으로 교차 반응한다는 것이다. 그러므로, 폴리펩타이드는 전형적으로 제2 폴리펩타이드와 실질적으로 동일하며, 예를 들어, 두 펩타이드는 보존적 치환에 의해서만 상이하다. 두 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 또 다른 지표는 두 분자가 엄격한 조건 하에서 서로에게 혼성화한다는 것이다.
- [0078] 본원에서 사용되는 바, 용어 "분리된"은 생물학적 구성요소(예컨대 핵산, 펩타이드 또는 단백질)가 구성요소가 자연적으로 발생하는 유기체의 다른 생물학적 구성요소, 즉, 다른 염색체 및 염색체의 DNA 및 RNA, 및 단백질로부터 실질적으로 분리되었거나, 그로부터 생성되었거나, 또는 정제된 것을 의미한다. "분리된" 핵산, 펩타이드 및 단백질에는 그러므로 표준 정제 방법에 의해 정제된 핵산 및 단백질이 포함된다. "분리된" 핵산, 펩타이드 및 단백질은 조성물의 일부일 수 있고 만약 조성물이 핵산, 펩타이드, 또는 단백질의 천연 환경의 일부가 아니라면 여전히 분리될 수 있다. 용어는 또한 숙주 세포에서 재조합 발현에 의해 제조된 핵산, 펩타이드 및 단백질 뿐만 아니라 화학적으로 합성된 핵산을 포함한다.
- [0079] 본원에서 사용되는 바, "핵산 분자", "뉴클레오타이드" 또는 "핵산"과도 동의어로 언급되는 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 비변형 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있는 임의의 폴리리보뉴클레오타이드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오타이드를 지칭한다. "폴리뉴클레오타이드"에는, 제한 없이 단일 및 이중 가닥 DNA, 단일 및 이중 가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일 및 이중 가닥 RNA, 단일 및 이중 가닥 영역의 혼합물인 RNA, 단일 가닥일 수 있는, 또는 보다 전형적으로는 이중 가닥 또는 단일 및 이중 가닥 영역의 혼합물일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자가 포함된다. 더불어, "폴리뉴클레오타이드"는 RNA 또는 DNA 또는 RNA 및 DNA 둘 다를 포함하는 삼중 가닥 영역을 지칭한다. 용어 폴리뉴클레오타이드에는 또한 하나 이상의 변형된 염기를 함유하는 DNA 또는 RNA 및 안정성 또는 다른 이유로 변형된 백본을 가진 DNA 또는 RNA가 포함된다. "변형된" 염기에는, 예를 들어, 트리틸화된 염기 및 이노신과 같은 특이한 염기가 포함된다. 다양한 변형이 DNA 및 RNA에 대해 이루어질 수 있다; 그러므로, "폴리뉴클레오타이드"는 전형적으로 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오타이드의 화학적으로, 효소적으로 또는 대사적으로 변형된 형태, 뿐만 아니라 바이러스 및 세포의 DNA 및 RNA 특징의 화학적 형태를 포함한다. "폴리뉴클레오타이드"는 또한 종종 올리고뉴클레오타이드로서 언급되는 상대적으로 짧은 핵산 사슬을 포함한다.
- [0080] 본원에서 사용되는 바, 용어 "백터"는 또 다른 핵산 분질이 분질의 복제 또는 발현을 유발시키기 위해 작동 가능하게 삽입될 수 있는 레플리콘이다.
- [0081] 본원에서 사용되는 바, 용어 "숙주 세포"는 발명의 핵산 분자를 포함하는 세포를 지칭한다. "숙주 세포"는 임의의 유형의 세포, 예컨대, 일차 세포, 배양 중의 세포, 또는 세포주로부터의 세포일 수 있다. 한 구체예에서, "숙주 세포"는 발명의 핵산 분자로 형질감염된 세포이다. 또 다른 구체예에서, "숙주 세포"는 그러한 형질감염된 세포의 자손 또는 잠재적 자손이다. 세포의 자손은 모 세포와 동일할 수 있거나 또는 예컨대, 이어지는 세대에서 발생할 수 있는 돌연변이 또는 환경적 영향 또는 핵산 분자의 숙주 세포 계놈으로의 통합으로 인해 동일하지 않을 수 있다.
- [0082] 용어 "발현"은 본원에서 사용되는 바, 유전자 생성물의 생합성을 지칭한다. 용어는 유전자의 RNA로의 전사를 포함한다. 용어는 또한 RNA의 하나 이상의 폴리펩타이드로의 번역을 포함하며, 추가로 모든 자연적으로 발생하는 전사 후 및 번역 후 변형을 포함한다. 발현된 항체는 숙주 세포의 세포질 내에 있을 수 있고, 세포 배양의 성장 배지와 같은 세포의 환경으로 가거나 세포막에 고정될 수 있다.
- [0083] 본원에서 사용되는 바, 용어 "펩타이드", "폴리펩타이드", 또는 "단백질"은 아미노산으로 구성된 분자를 지칭할 수 있고 기술분야에 숙련된 사람들에게는 단백질로서 인식될 수 있다. 아미노산 잔기에 대한 종래의 한문자 또는 3-문자 코드가 본원에서 사용된다. 용어 "펩타이드", "폴리펩타이드", 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노

산의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비아미노산에 의해 방해될 수 있다. 용어는 또한 자연적으로 또는 개입; 예를 들어, 이황화 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대 표지화 구성요소와의 콘주게이션에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포함한다. 또한 정의에는, 예를 들어, 아미노산의 하나 이상의 유사체(예를 들어, 비천연 아미노산 등을 포함함), 뿐만 아니라 기술분야에 알려져 있는 다른 변형을 함유한 폴리펩타이드가 포함된다.

[0084] 본원에 기술된 펩타이드 서열은 통상적인 관례에 따라 표기됨으로써 펩타이드의 N 말단 영역이 좌측에 있고 C 말단 영역이 우측에 있다. 비록 아미노산의 이성질체 형태가 알려져 있지만, 명백하게 다르게 표시되지 않는 한 아미노산의 L 형태가 표시된다.

[0085] **항체**

[0086] 발명은 일반적으로 분리된 항-케모카인(C-C 모티프) 수용체 8 항체, 항체를 암호화하는 핵산 및 발현 벡터, 벡터를 함유하는 재조합 세포, 항체를 발현하는 재조합 세포, 및 항체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 항체의 제조 방법, 및 암과 같은 질환을 치료하기 위해 항체를 사용하는 방법이 또한 개시된다. 발명의 항체는, 한정하는 것은 아니지만, CCR8에 대한 고친화도 결합, CCR8에 대한 높은 특이성, 항체 의존적 세포의 식세포작용(ADCP)을 자극하는 능력 및/또는 CCR8을 발현하는 세포에 대한 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC), 및 단독으로 또는 다른 항암 요법과 함께 투여되었을 때 대상체 및 동물 모델에서 종양 성장을 억제하는 능력을 포함한 하나 이상의 바람직한 기능적 특성을 가지고 있다.

[0087] 일반적인 측면으로, 발명은 케모카인(C-C 모티프) 수용체 8(CCR8)에 결합하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[0088] 본원에서 사용되는 바, 용어 "항체"는 넓은 의미로 사용되며 면역글로불린 또는 인간, 인간화된, 혼성물 및 키메라 항체 및 항체 단편을 포함한, 단클론성 또는 다클론성인 항체 분자를 포함한다. 일반적으로, 항체는 특정 항원에 대한 결합 특이성을 나타내는 단백질 또는 펩타이드 사슬이다. 면역글로불린은 중쇄 불변 도메인 아미노산 서열에 따라 5가지의 주요 부류(즉, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM)에 할당될 수 있다. IgA 및 IgG는 아이소타입 IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 한층 더 하위 분류된다. 따라서, 발명의 항체는 5가지 주요 부류 또는 상응하는 하위 부류 중 임의의 것일 수 있다. 바람직하게는, 발명의 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 척추동물 종의 항체 경쇄는 그것의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로 2개의 명확하게 구별되는 유형 중 하나, 즉 카파 및 람다에 할당될 수 있다. 따라서, 발명의 항체는 카파 또는 람다 경쇄 불변 도메인을 함유할 수 있다. 특정 구체예에 따르면, 발명의 항체는 래트 또는 인간 항체로부터의 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 외에, 항체는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역으로 구성되는 항원 결합 영역을 함유하며, 이들의 각각은 3개의 도메인(즉, 상보성 결정 영역 1-3; CDR1, CDR2, 및 CDR3)을 함유한다. 경쇄 가변 영역 도메인은 대안적으로 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3으로 언급되고, 중쇄 가변 영역 도메인은 대안적으로 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3으로서 언급된다.

[0089] 본원에서 사용되는 바, 용어 "분리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 가진 다른 항체가 실질적으로 없다(예컨대, CCR8에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 CCR8에 결합하지 않는 항체가 실질적으로 없다). 더불어, 분리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없다.

[0090] 본원에서 사용되는 바, 용어 "단클론성 항체"는 실질적으로 균일한 항체의 집단으로부터 얻어진 항체, 즉, 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연적으로 발생하는 돌연변이를 제외하고 동일한 집단을 포함하는 개별 항체를 지칭한다. 발명의 단클론성 항체는 하이브리도마 방법, 파지 디스플레이 기술, 단일 림프구 유전자 클로닝 기술에 의해, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 만들어질 수 있다. 예를 들어, 단클론성 항체는 인간 중쇄 도입유전자 및 경쇄 도입유전자를 포함하는 게놈을 가지는 형질전환 비인간 동물, 예컨대 형질전환 마우스 또는 래트로부터 얻어진 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 제조될 수 있다.

[0091] 본원에서 사용되는 바, 용어 "항원 결합 단편"은 예를 들어, 디아바디, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv 단편, 이황화 안정화된 Fv 단편(dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 이황화 안정화된 디아바디(ds 디아바디), 단일 사슬 항체 분자(scFv), 단일 도메인 항체(sdab), scFv 이량체(2가 디아바디), 하나 이상의 CDR을 포함하는 항체의 일부로부터 형성된 다중특이적 항체, 낙타과화된 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 2가 도메인 항체, 또는 완전한 항체 구조를 포함하지 않지만 항원에 결합하는 임의의 다른 항체 단편과 같은 항체 단편을 지칭한다. 항원 결합 단편은 모 항체 또는 모 항체 단편이 결합하는 동일 항원에 결합할 수 있다. 특정 구체예

에 따르면, 항원 결합 단편은 경쇄 가변 영역, 경쇄 불변 영역, 및 중쇄의 Fd 분절을 포함한다. 다른 특정 구체예에 따르면, 항원 결합 단편은 Fab 및 F(ab')를 포함한다.

- [0092] 본원에서 사용되는 바, 용어 "단일 사슬 항체"는 약 15 내지 약 20개의 아미노산의 짧은 펩타이드에 의해 연결된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 기술분야의 종래의 단일 사슬 항체를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "단일 도메인 항체"는 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역을 포함하거나 또는 중쇄 가변 영역만을 포함하는 기술분야의 종래의 단일 사슬 항체를 지칭한다.
- [0093] 본원에서 사용되는 바, 용어 "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체 또는 기술분야에 알려져 있는 임의의 기법을 사용하여 만들어진 인간에 의해 생성된 항체에 상응하는 아미노산 서열을 가지는 항체를 지칭한다. 인간 항체의 이 정의에는 온전한 또는 전장 항체, 그것의 단편, 및/또는 적어도 하나의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체가 포함된다.
- [0094] 본원에서 사용되는 바, 용어 "인간화된 항체" 및/또는 "인간화된 항원 결합 도메인"은 인간 항체의 서열에 대한 서열 상동성이 증가되도록 변형되어서 항체의 항원 결합 특성이 유지되지만, 인간 체내에서 항원성은 감소되는 비인간 항체를 지칭한다.
- [0095] 본원에서 사용되는 바, 용어 "키메라 항체"는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열이 둘 이상의 종으로부터 유래된 항체를 지칭한다. 경쇄 및 중쇄 둘 다의 가변 영역은 종종 원하는 특이성, 친화도, 및 수용력을 갖는 포유류의 한 종(예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 등)으로부터 유래된 항체의 가변 영역에 상응하지만, 불변 영역은 그 종에서 면역 반응이 유도되는 것을 피하기 위해 포유류의 또 다른 종(예컨대, 인간)으로부터 유래된 항체의 서열에 상응한다.
- [0096] 본원에서 사용되는 바, 용어 "다중 특이적 항체"는 복수의 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함하는 항체를 지칭하며, 여기서 복수 중 제1 면역글로불린 가변 도메인 서열은 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 가지며 복수 중 제2 면역글로불린 가변 도메인 서열은 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 가진다. 한 구체예에서, 제1 및 제2 에피토프는 동일한 항원, 예컨대, 동일한 단백질(또는 다량체 단백질의 하위단위) 상에 있다. 한 구체예에서, 제1 및 제2 에피토프는 중첩하거나 실질적으로 중첩한다. 한 구체예에서, 제1 및 제2 에피토프는 중첩하지 않거나 실질적으로 중첩하지 않는다. 한 구체예에서, 제1 및 제2 에피토프는 상이한 항원, 예컨대, 상이한 단백질(또는 다량체 단백질의 상이한 하위단위) 상에 있다. 한 구체예에서, 다중 특이적 항체는 제3, 제4, 또는 제5 면역글로불린 가변 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 다중 특이적 항체는 이중특이적 항체 분자, 삼중특이적 항체 분자, 또는 사중특이적 항체 분자이다.
- [0097] 본원에서 사용되는 바, 용어 "이중특이적 항체"는 2개 이하의 에피토프 또는 2개 이하의 항원에 결합하는 다중 특이적 항체를 지칭한다. 이중특이적 항체는 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 가진 제1 면역글로불린 가변 도메인 서열 및 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 가진 제2 면역글로불린 가변 도메인 서열을 특징으로 한다. 한 구체예에서, 제1 및 제2 에피토프는 동일한 항원, 예컨대, 동일한 단백질(또는 다량체 단백질의 하위단위) 상에 있다. 한 구체예에서, 제1 및 제2 에피토프는 중첩하거나 실질적으로 중첩한다. 한 구체예에서, 제1 및 제2 에피토프는 상이한 항원, 예컨대, 상이한 단백질(또는 다량체 단백질의 상이한 하위단위) 상에 있다. 한 구체예에서, 이중특이적 항체는 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 가지는 중쇄 가변 도메인 서열 및 경쇄 가변 도메인 서열 및 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 가지는 중쇄 가변 도메인 서열 및 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 이중특이적 항체는 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 절반 항체, 또는 그것의 단편 및 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 절반 항체, 또는 그것의 단편을 포함한다. 한 구체예에서, 이중특이적 항체는 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 scFv, 또는 그것의 단편 및 제2 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 scFv, 또는 그것의 단편을 포함한다. 한 구체예에서, 제1 에피토프는 CCR8 상에 위치하고 제2 에피토프는 PD-1, PD-L1, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD3, 및/또는 다른 종양 관련 면역 억제자 또는 표면 항원 상에 위치한다.
- [0098] 본원에서 사용되는 바, "CCR8에 특이적으로 결합하는" 항체는 CCR8, 바람직하게는 인간 CCR8에,  $1 \times 10^{-7}$  M 이하, 바람직하게는  $1 \times 10^{-8}$  M 이하, 보다 바람직하게는  $5 \times 10^{-9}$  M 이하,  $1 \times 10^{-9}$  M 이하,  $5 \times 10^{-10}$  M 이하, 또는  $1 \times 10^{-10}$  M 이하의 KD로 결합하는 항체 및/또는 항원 결합 도메인을 지칭한다. 특정 구체예에서, 항체 및/또는 항원 결합 도메인은 시노몰구스 CCR8에 결합한다. 용어 "KD"는 Kd 대 Ka의 비율(즉, Kd/Ka)로부터 얻어지고 몰 농도(M)로서 표시되는 해리 상수를 지칭한다. 항체에 대한 KD 값은 본 개시의 관점에서 기술분야의 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 항체의 KD는 표면 플라즈몬 공명을 사용함으로써, 예컨대 바이오센서 시스템, 예컨대,

Biacore® 시스템을 사용함으로써, 또는 생물층 간섭계 기술, 예컨대 Octet RED96 시스템을 사용함으로써 결정될 수 있다.

- [0099] 항체의 KD의 값이 작을수록, 항체는 더 높은 친화도로 표적 항원에 결합한다.
- [0100] 본원에서 사용되는 바 용어 "IC<sub>50</sub>"은 발명의 단클론성 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편의 최대 억제 농도의 절반을 지칭한다. IC<sub>50</sub>은 CCL1의 CCR8에의 결합을 억제하거나 세포에서 CCR8의 기능을 억제하기 위한 발명의 단클론성 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편의 효능의 척도이다. 특정 구체예에서, 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 약 10<sup>-7</sup> M 미만, 약 10<sup>-8</sup> M 미만, 약 10<sup>-9</sup> M 미만, 약 10<sup>-10</sup> M 미만, 약 10<sup>-11</sup> M 미만, 약 10<sup>-12</sup> M 미만, 또는 약 10<sup>-13</sup> M 미만의 KD를 가진다.
- [0101] 본원에서 사용되는 바 용어 "EC<sub>50</sub>"은 발명의 단클론성 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편의 최대 유효 농도의 절반을 지칭한다. EC<sub>50</sub>은 명시된 노출 시간 동안 기준선과 최대 사이의 절반의 생물학적 반응(즉, 세포 사멸)을 유도하기 위한 단클론성 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편의 농도를 지칭한다. 특정 구체예에서, 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 약 1 μM 미만, 약 1000 nM 내지 약 100 nM, 약 100 nM 내지 약 10 nM, 약 10 nM 내지 약 1 nM, 약 1000 pM 내지 약 500 pM, 약 500 pM 내지 약 200 pM, 약 200 pM 미만, 약 200 pM 내지 약 150 pM, 약 200 pM 내지 약 100 pM, 약 100 pM 내지 약 10 pM, 또는 약 10 pM 내지 약 1 pM의 EC<sub>50</sub>을 가진다.
- [0102] 특정 측면에 따르면, 발명은 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것으로, 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 항원 결합 도메인은:
  - [0103] (1) 각각 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 및 6;
  - [0104] (2) 각각 서열 번호: 13, 2, 14, 4, 28, 및 6;
  - [0105] (3) 각각 서열 번호: 13, 2, 15, 4, 5, 및 6;
  - [0106] (4) 각각 서열 번호: 16, 17, 18, 29, 30, 및 6;
  - [0107] (5) 각각 서열 번호: 19, 20, 21, 4, 5, 및 6;
  - [0108] (6) 각각 서열 번호: 22, 23, 24, 31, 5, 및 32; 또는
  - [0109] (7) 각각 서열 번호: 25, 26, 27, 33, 34, 및 35
 의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2, HCDR3, 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2, 및 LCDR3을 포함하고;
- [0111] 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 그것의 항원 결합 도메인은 케모카인(C-C 모티프) 수용체 8(CCR8), 바람직하게는 인간 CCR8에 특이적으로 결합한다.
- [0112] 또 다른 특정 측면에 따르면, 발명은 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것으로, 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:7, 36, 38, 40, 42, 44, 또는 46에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 서열 번호:8, 37, 39, 41, 43, 45, 또는 47에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 바람직한 측면에 따르면, 발명의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 각각, 서열 번호: 7에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호: 8에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0113] 특정 구체예에 따르면, 분리된 항-CCR8 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은:
  - [0114] (1) 서열 번호:7의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:8의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

- [0115] (2) 서열 번호:36의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:37의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- [0116] (3) 서열 번호:38의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:39의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- [0117] (4) 서열 번호:40의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:41의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- [0118] (5) 서열 번호:42의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:43의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- [0119] (6) 서열 번호:44의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:45의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0120] (7) 서열 번호:46의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:47의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역
- [0121] 을 포함한다.
- [0122] 한 구체예에서, 발명은 각각 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 및 6의 폴리펩타이드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:7에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:8에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직하게, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:7의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호:8의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0123] 한 구체예에서, 발명은 각각, 서열 번호: 13, 2, 14, 4, 28, 및 6의 폴리펩타이드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:36에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:37에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직하게, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:36의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호:37의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0124] 한 구체예에서, 발명은 각각, 서열 번호: 13, 2, 15, 4, 5, 및 6의 폴리펩타이드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:38에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:39에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직하게, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:38의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호:39의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0125] 한 구체예에서, 발명은 각각, 서열 번호: 16, 17, 18, 29, 30, 및 6의 폴리펩타이드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:40에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:41에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직하게, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:40의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호:41의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0126] 한 구체예에서, 발명은 각각, 서열 번호: 19, 20, 21, 4, 5, 및 6의 폴리펩타이드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2,

HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:42에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:43에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직하게, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:42의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호:43의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0127] 한 구체예에서, 발명은 각각, 서열 번호: 22, 23, 24, 31, 5, 및 32의 폴리펩타이드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:44에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:45에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직하게, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:44의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호:45의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0128] 한 구체예에서, 발명은 각각, 서열 번호: 25, 26, 27, 33, 34, 및 35의 폴리펩타이드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:46에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:47에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직하게, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:46의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호:47의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0129] 또 다른 특정 측면에 따르면, 발명은 발명의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것으로, 단클론성 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 키메릭이다.

[0130] 또 다른 특정 측면에 따르면, 발명은 발명의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것으로, 단클론성 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 인간 또는 인간화된 것이다.

[0131] 또 다른 특정 측면에 따르면, 발명은:

[0132] (1) 각각 서열 번호: 1, 48, 49, 50, 51, 및 6;

[0133] (2) 각각 서열 번호: 1, 2, 49, 4, 5, 및 6;

[0134] (3) 각각 서열 번호: 1, 2, 49, 50, 51, 및 6;

[0135] (4) 각각 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 및 6; 또는

[0136] (5) 각각 서열 번호: 1, 48, 49, 50, 51, 및 6

[0137] 의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2, HCDR3, 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 인간화된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[0138] 또 다른 특정 측면에 따르면, 발명은 인간화된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것으로, 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:9, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 또는 60에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 서열 번호:10, 61, 62, 또는 63에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0139] 또 다른 특정 측면에 따르면, 인간화된 항-CCR8 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은:

[0140] (1) 서열 번호:9의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

- [0141] (2) 서열 번호:52의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:63의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- [0142] (3) 서열 번호:52의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- [0143] (4) 서열 번호:53의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영;
- [0144] (5) 서열 번호:54의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:63의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0145] (6) 서열 번호:59의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:62의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역
- [0146] 을 포함한다.
- [0147] 한 구체예에서, 발명은 각각, 서열 번호: 1, 48, 49, 50, 51, 및 6의 폴리펩타이드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:9에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직하게, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:9의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0148] 한 구체예에서, 발명은 각각, 서열 번호: 1, 2, 49, 4, 5, 및 6의 폴리펩타이드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:52에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:63에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직하게, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:52의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호:63의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0149] 한 구체예에서, 발명은 각각, 서열 번호: 1, 2, 49, 50, 51, 및 6의 폴리펩타이드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:52에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직하게, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:52의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0150] 한 구체예에서, 발명은 각각, 서열 번호: 1, 2, 49, 50, 51, 및 6의 폴리펩타이드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:53에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직하게, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:53의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0151] 한 구체예에서, 발명은 각각, 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 및 6의 폴리펩타이드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:54에 대해 적어도 85%, 바

람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:63에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직하게, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:54의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호:63의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0152] 한 구체예에서, 발명은 각각, 서열 번호: 1, 48, 49, 50, 51, 및 6의 폴리펩타이드 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:59에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:62에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 또는 그 이상, 예컨대 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 바람직하게, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 서열 번호:59의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호:62의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0153] 또 다른 일반적인 측면으로, 발명은 발명의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 및/또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 분리된 핵산에 관한 것이다. 기술분야에 숙련된 사람들은 단백질의 아미노산 서열을 변경하지 않으면서 단백질의 코딩 서열이 변경(예컨대, 대체, 결실, 삽입, 등)될 수 있음을 인정할 것이다. 따라서, 기술분야에 숙련된 사람들에게는 발명의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산 서열이 단백질의 아미노산 서열을 변경하지 않으면서 변경될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0154] 또 다른 일반적인 측면으로, 발명은 발명의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 및/또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 분리된 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 본 개시의 관점에서 기술분야에 숙련된 사람들에게 알려져 있는 임의의 벡터, 예컨대 플라스미드, 코스미드, 파지 벡터 또는 바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 벡터는 플라스미드와 같은 재조합 발현 벡터이다. 벡터에는 발현 벡터의 종래 기능을 확립하기 위한 임의의 요소, 예를 들어, 프로모터, 리보솜 결합 요소, 터미네이터, 인핸서, 선택 마커, 및 복제 기원이 포함될 수 있다. 프로모터는 구성성, 유도성, 또는 억제성 프로모터일 수 있다. 세포에 핵산을 전달할 수 있는 많은 발현 벡터가 기술분야에 알려져 있고 세포에서 항체 또는 그것의 항원 결합 단편의 제조를 위해 본원에서 사용될 수 있다. 종래의 클로닝 기법 또는 인공 유전자 합성이 발명의 구체예에 따르는 재조합 발현 벡터를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0155] 또 다른 일반적인 측면으로, 발명은 발명의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 및/또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 분리된 핵산을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 본 개시의 관점에서 기술분야에 숙련된 사람들에게 알려져 있는 임의의 숙주 세포가 발명의 항체 또는 그것의 항원 결합 단편의 재조합 발현에 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 이. 콜라이(E. coli) TG1 또는 BL21 세포(예컨대, scFv 또는 Fab 항체의 발현의 경우), CHO-DG44 또는 CHO-K1 세포 또는 HEK293 세포(예컨대, 전장 IgG 항체의 발현의 경우)이다. 특정 구체예에 따르면, 재조합 발현 벡터는 화학적 형질감염, 열 충격, 또는 전기천공과 같은 종래 방법에 의해 숙주 세포로 형질전환되며, 숙주 세포에서 재조합 핵산이 효과적으로 발현되도록 숙주 세포 계능에 안정적으로 통합된다.

[0156] 또 다른 일반적인 측면으로, 발명은 발명의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 및/또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 제조하는 방법에 관한 것이며, 방법은 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산을 포함하는 세포를 발명의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 생성하기 위한 조건 하에서 배양하는 단계, 및 세포 또는 세포 배양으로부터(예컨대, 상층액으로부터) 단클론성 및/또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함한다. 발현된 단클론성 및/또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 기술분야에 알려져 있고 본원에 기술된 것과 같은 종래 기법에 따라 세포로부터 수득되고 정제될 수 있다.

[0157] **제약학적 조성물**

[0158] 또 다른 일반적인 측면으로, 발명은 발명의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 분리된 폴리뉴클레오타이드, 및/또는 분리된 폴리펩타이드 및 제약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 제약학적 조성물에 관한 것이다.

- [0159] 본원에서 사용된 용어 "제약학적 조성물"은 발명의 분리된 폴리뉴클레오타이드, 발명의 분리된 폴리펩타이드, 발명의 항-CCR8 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 및/또는 이중특이적 항체를 제약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 포함하는 생성물을 의미한다. 발명의 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드, 항-CCR8 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편, 및/또는 이중특이적 항체 및 그것들을 포함하는 조성물 또한 본원에서 언급된 치료용 의약품의 제조에 유용하다.
- [0160] 본원에서 사용되는 바, 용어 "담체"는 임의의 부형제, 희석제, 충전제, 염, 완충제, 안정화제, 가용화제, 오일, 지질, 지질 함유 소포, 마이크로스피어, 리포솜 캡슐화, 또는 제약학적 제제에 사용하기 위한 기술분야에 잘 알려져 있는 다른 물질을 지칭한다. 담체, 부형제 또는 희석제의 특징은 특정 적용을 위한 투여 경로에 따라 달라질 것임이 이해될 것이다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "제약학적으로 허용 가능한 담체"는 발명에 따르는 조성물의 유효성 또는 발명에 따르는 조성물의 생물학적 활성을 간섭하지 않는 무독성 물질을 지칭한다. 특정 구체예에 따르면, 본 개시의 관점에서, 항체 제약학적 조성물에 사용하기에 적합한 임의의 제약학적으로 허용 가능한 담체가 발명에 사용될 수 있다.
- [0161] 제약학적으로 활성 성분과 제약학적으로 허용 가능한 담체의 제제의 기술분야에, 예컨대, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy (예컨대 21st edition (2005), 및 임의의 이후 편집본)]에 알려져 있다. 추가적인 성분의 비제한적인 예로는 완충제, 희석제, 용매, 등장성 조절제, 보존제, 안정화제, 및 킬레이트화제를 들 수 있다. 하나 이상의 제약학적으로 허용 가능한 담체(들)가 발명의 제약학적 조성물을 제제화하는 데 사용될 수 있다.
- [0162] 발명의 한 구체예에서, 제약학적 조성물은 지질 제제이다. 지질 제제의 바람직한 예는 수성 제제, 즉 물을 포함하는 제제이다. 액체 제제는 용액, 현탁액, 에멀션, 마이크로에멀션, 겔, 등을 포함할 수 있다. 수성 제제는 전형적으로 적어도 50% 중량/중량 물, 또는 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 적어도 95% 중량/중량의 물을 포함한다.
- [0163] 한 구체예에서, 제약학적 조성물은 예를 들어, 주사 장치(예컨대, 주사기 또는 주입 펌프)를 통해 주사될 수 있는 주사용으로서 제제화될 수 있다. 주사제는 예를 들어 피하로, 근육내로, 복강내로, 유리체강내로, 또는 정맥내로 전달될 수 있다.
- [0164] 또 다른 구체예에서, 제약학적 조성물은 그대로 사용될 수 있거나, 또는 의사 또는 환자가 사용 전에 용매, 및/또는 희석제를 첨가할 수 있는 고체 제형, 예컨대, 냉동 건조된 또는 분무 건조된 조성물이다. 고체 투여 형태에는 정제, 예컨대 압축 정제, 및/또는 코팅 정제, 및 캡슐(예컨대, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐)이 포함될 수 있다. 제약학적 조성물은 또한 예를 들어 사세, 당의정, 분말, 과립, 로젠지, 또는 재구성용 분말의 형태일 수 있다.
- [0165] 투여 형태는 즉시 방출형일 수 있는데 이 경우 형태는 수용성 또는 분산성 담체를 포함할 수 있고, 또는 지연 방출, 지속성 방출, 또는 고정된 방출 형태일 수 있으며, 이 경우 형태는 위장관 또는 피부 아래에서 투여 형태의 분해 속도를 조절하는 수불용성 중합체를 포함할 수 있다.
- [0166] 다른 구체예에서, 제약학적 조성물은 비강내로, 협측으로, 또는 허밀로로 전달될 수 있다.
- [0167] 수성 제제의 pH는 pH 3과 pH 10 사이일 수 있다. 발명의 한 구체예에서, 제제의 pH는 약 7.0 내지 약 9.5이다. 발명의 또 다른 구체예에서, 제제의 pH는 약 3.0 내지 약 7.0이다.
- [0168] 발명의 또 다른 구체예에서, 제약학적 조성물은 완충제를 포함한다. 완충제의 비제한적인 예로는: 아르기닌, 아스파르트산, 바이신, 시트레이트, 인산 수소 이나트륨, 푸마르산, 글리신, 글리실글리신, 히스티딘, 리신, 말레산, 아세트산 나트륨, 탄산 나트륨, 인산 이수소 나트륨, 인산 나트륨, 석시네이트, 타르타르산, 트리신, 및 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄, 및 이것들의 혼합물을 들 수 있다. 완충제는 약 0.01 mg/ml 내지 약 50 mg/ml, 예를 들어 약 0.1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml의 농도로, 개별적으로 또는 응집체로 존재할 수 있다. 이들 특정 완충제의 각각 하나를 포함하는 제약학적 조성물은 발명의 대체 구체예를 구성한다.
- [0169] 발명의 또 다른 구체예에서, 제약학적 조성물은 보존제를 포함한다. 보존제의 비제한적인 예로는: 염화 벤제토늄, 벤조산, 벤질 알코올, 브로노폴, 부틸 4-하이드록시벤조에이트, 클로로부탄올, 클로로크레졸, 클로로헥시딘, 클로르페네신, o-크레졸, m-크레졸, p-크레졸, 에틸 4-하이드록시벤조에이트, 이미두레아, 메틸 4-하이드록시벤조에이트, 페놀, 2-페녹시에탄올, 2-페닐에탄올, 프로필 4-하이드록시벤조에이트, 데하이드로아세트산 나트륨, 티오메로살, 및 이것들의 혼합물을 들 수 있다. 보존제는 약 0.01 mg/ml 내지 약 50 mg/ml, 예

를 들어 약 0.1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml의 농도로, 개별적으로 또는 응집체로 존재할 수 있다. 이들 특정 보존제의 각각 하나를 포함하는 제약학적 조성물은 발명의 대체 구체예를 구성한다.

[0170] 발명의 또 다른 구체예에서, 제약학적 조성물은 등장성 작용제를 포함한다. 등장성 작용제의 비제한적인 예로는 염(예컨대 염화 나트륨), 아미노산(예컨대 글리신, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 아이소류신, 아스파르트산, 트립토판, 및 트레오닌), 알디톨(예컨대 글리세롤, 1,2-프로판다이올 프로필렌글리콜), 1,3-프로판다이올, 및 1,3-부탄다이올), 폴리에틸렌글리콜(예컨대, PEG400), 및 이것들의 혼합물을 들 수 있다. 등장성 작용제의 또 다른 예로는 당을 들 수 있다. 당의 비제한적인 예는 단당, 이당, 또는 다당, 또는 수용성 글루칸, 이를테면 예를 들어 프룩토스, 글루코스, 만노스, 소르보스, 자일로스, 말토스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 텍스트란, 풀룰란, 텍스트린, 사이클로텍스트린, 알파 및 베타-HPCD, 가용성 전분, 하이드록시에틸 전분, 및 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스일 수 있다. 등장성 작용제의 또 다른 예는 당 알코올이며, 용어 "당 알코올"은 적어도 하나의 -OH기를 갖는 C(4-8) 탄화수소로서 정의된다. 당 알코올의 비제한적인 예로는 만니톨, 소르비톨, 갈락티톨, 들시톨, 자일리톨, 및 아라비톨을 들 수 있다. 등장성 작용제는 약 0.01 mg/ml 내지 약 50 mg/ml, 예를 들어 약 0.1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml의 농도로, 개별적으로 또는 응집체로 존재할 수 있다. 이들 특정 등장성 작용제의 각각 하나를 포함하는 제약학적 조성물은 발명의 대체 구체예를 구성한다.

[0171] 발명의 또 다른 구체예에서, 제약학적 조성물은 킬레이트화제를 포함한다. 킬레이트화제의 비제한적인 예로는 시트르산, 아스파르트산, 에틸렌다이아민테트라아세트산의 염(EDTA), 및 이것들의 혼합물을 들 수 있다. 킬레이트화제는 약 0.01 mg/ml 내지 약 50 mg/ml, 예를 들어 약 0.1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml의 농도로, 개별적으로 또는 응집체로 존재할 수 있다. 이들 특정 킬레이트화제의 각각 하나를 포함하는 제약학적 조성물은 발명의 대체 구체예를 구성한다.

[0172] 발명의 또 다른 구체예에서, 제약학적 조성물은 안정화제를 포함한다. 안정화제의 비제한적인 예로는 하나 이상의 응집 억제제, 하나 이상의 산화 억제제, 하나 이상의 계면활성제, 및/또는 하나 이상의 프로테아제 억제제를 들 수 있다.

[0173] 발명의 또 다른 구체예에서, 제약학적 조성물은 안정화제를 포함하며, 상기 안정화제는 카르복시-/하이드록시셀룰로오스 및 이것의 유도체(예컨대 HPC, HPC-SL, HPC-L 및 HPMC), 사이클로텍스트린, 2-메틸티오에탄올, 폴리에틸렌 글리콜(예컨대 PEG 3350), 폴리비닐 알코올(PVA), 폴리비닐 피롤리돈, 염(예컨대 염화 나트륨), 모노티오글리세롤과 같은 황 함유 물질), 또는 티오글리콜산이다. 안정화제는 약 0.01 mg/ml 내지 약 50 mg/ml, 예를 들어 약 0.1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml의 농도로, 개별적으로 또는 응집체로 존재할 수 있다. 이들 특정 안정화제의 각각 하나를 포함하는 제약학적 조성물은 발명의 대체 구체예를 구성한다.

[0174] 발명의 추가 구체예에서, 제약학적 조성물은 하나 이상의 계면활성제, 바람직하게는 계면활성제, 적어도 하나의 계면활성제, 또는 2개의 상이한 계면활성제를 포함한다. 용어 "계면활성제"는 수용성(친수성) 부분, 및 지용성(친유성) 부분으로 구성된 임의의 분자 또는 이온을 지칭한다. 계면활성제는, 예를 들어, 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, 및/또는 양쪽성 이온성 계면활성제로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 계면활성제는 약 0.1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml의 농도로, 개별적으로 또는 응집체로 존재할 수 있다. 이들 특정 계면활성제의 각각 하나를 포함하는 제약학적 조성물은 발명의 대체 구체예를 구성한다.

[0175] 발명의 추가 구체예에서, 제약학적 조성물은 하나 이상의 프로테아제 억제제, 예컨대, EDTA, 및/또는 벤자미딘 염산(HCl)을 포함한다. 프로테아제 억제제는 약 0.1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml의 농도로, 개별적으로 또는 응집체로 존재할 수 있다. 이들 특정 프로테아제 억제제의 각각 하나를 포함하는 제약학적 조성물은 발명의 대체 구체예를 구성한다.

[0176] 또 다른 일반적인 측면으로, 발명은 제약학적 조성물을 얻기 위하여 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 및/또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 제약학적으로 허용 가능한 담체와 조합시키는 단계를 포함하는, 발명의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 및/또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 제약학적 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0177] **사용 방법**

[0178] 또 다른 일반적인 측면으로, 발명은 발명의 항-CCR8 단클론성 및/또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 제약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 암은, 예를 들어, 한정하는 것은 아니지만, 폐암, 두경부암, 식도암, 위암, 대장암, 유방암, 췌장암, 난소암, 신장암, 및 흑색종으로부터 선택될 수 있다.

- [0179] 일부 측면으로, 방법은 발명의 항-CCR8 단클론성 및/또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 제약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 필요로 하는 대상체에서 종양 침윤 조절 T 세포 (TITC) 고갈을 유도하는 방법에 관련되었다. 다양한 측면으로, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함한 다른 T 세포는 유도된 세포 고갈에 의해 영향을 받지 않는다. 다른 측면으로, 방법은 종양 미세환경의 재프로그래밍을 추가로 유도한다. 다양한 측면으로, TITC 고갈을 유도하는 것에는 CCR8 발현 암세포의 자연 살해(NK) 매개 사멸을 유도하는 것이 포함된다. 다른 측면으로, NK 매개 사멸을 유도하는 것에는 TITC 유도된 면역억제가 포함된다.
- [0180] 또 다른 일반적인 측면으로, 발명은 세포 사멸을 달성하기 위하여 대상체에서 암세포 표면 상에 CCR8을 표적화하는 방법에 관한 것이며, 방법은 CCR8에 특이적으로 결합하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 및/또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 발명의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 및/또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 제약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 항-CCR8 단클론성 또는 이중특이적 항체 또는 항원 결합 단편의 CCR8에 대한 결합은 항체 의존성 세포의 식세포작용(ADCP), 및/또는 항체 의존성 세포의 세포독성(ADCC) 또는 표적화된 암세포의 사멸을 초래하는 다른 효과를 매개할 수 있다. 단클론성 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은, 예를 들어, 콘주게이션된 약물을 모집하는 작용을 할 수 있고/거나, 또 다른 단클론성 항체와 이중특이적 항체를 형성하여 표적화된 암세포의 사멸을 매개할 수 있다.
- [0181] CCR8에 결합하는 항체 및 그것의 항원 결합 단편의 기능적 활성은 기술분야에 알려져 있고 본원에서 기술된 방법에 의해 특성화될 수 있다. CCR8에 결합하는 항체 및 그것의 항원 결합 단편을 특성화하는 방법에는, 한정하는 것은 아니지만, Biacore, ELISA, 및 OctetRed 분석을 포함한 친화성 및 특이성 검정, 및 세포(CCR8로 형질감염된 세포 또는 자연적으로 CCR8을 발현하는 세포) 상에서 CCR8에 대한 항체 및 항원 결합 단편의 결합의 FACS에 의한 검출이 포함된다. 특정 구체예에 따르면, CCR8에 결합하는 항체 및 그것의 항원 결합 단편을 특성화하는 방법에는 아래에서 기술되는 것들이 포함된다.
- [0182] 또 다른 일반적인 측면으로, 발명은 대상체에게 CCR8에 특이적으로 결합하는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 및/또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 발명의 제약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 암은, 예를 들어, 고형 종양, 바람직하게는 침윤하는 T 세포를 가진 고형 종양, 보다 바람직하게는 침윤하는 T reg 세포를 가진 고형 종양, 보다 바람직하게는 CCR8을 발현하는 고도 억제성 T reg 세포를 가진 고형 종양, 가장 바람직하게는 그것에 대하여 자연 살해(NK) 세포 침윤이 발생한 CCR8을 과다발현하는 침윤하는 고도 억제성 T reg 세포를 가진 고형 종양일 수 있다. 암은, 예를 들어, 한정하는 것은 아니지만, 폐암, 두경부암, 식도암, 위암, 대장암, 유방암, 췌장암, 난소암, 방광암, 간암, 신장암, 및 흑색종으로부터 선택될 수 있다. 특정 구체예에 따르면, 대상체는, 예를 들어, CCR8 발현 Treg을 포함할 수 있다.
- [0183] 본원에서 항-CCR8 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 참조로 사용되는 바, 치료적 유효량은 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 조절하는 항-CCR8 항체 또는 그것의 항원 결합 단편의 양을 의미한다. 또한, 본원에서 항-CCR8 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 참조로 사용되는 바, 치료적 유효량은 질환, 장애, 또는 병태의 치료를 초래하거나; 질환, 장애, 또는 병태의 진행을 방지 또는 둔화시키거나; 또는 질환, 장애, 또는 병태와 관련된 증상을 감소시키거나 완전히 완화시키는 항-CCR8 항체 또는 그것의 항원 결합 단편의 양을 의미한다.
- [0184] 특정 구체예에 따르면, 치료될 질환, 장애 또는 병태는 암이다. 암은, 예를 들어, 고형 종양, 바람직하게는 침윤하는 T 세포를 가진 고형 종양, 보다 바람직하게는 침윤하는 T reg 세포를 가진 고형 종양, 보다 바람직하게는 CCR8을 발현하는 고도 억제성 T reg 세포를 가진 고형 종양, 가장 바람직하게는 그것에 대하여 자연 살해(NK) 세포 침윤이 발생한 CCR8을 과다발현하는 침윤하는 고도 억제성 T reg 세포를 가진 고형 종양일 수 있다. 암은, 예를 들어, 한정하는 것은 아니지만, 폐암, 두경부암, 식도암, 위암, 대장암, 유방암, 췌장암, 난소암, 방광암, 간암, 신장암, 및 흑색종으로부터 선택될 수 있다.
- [0185] 특정 구체예에 따르면, 치료적 유효량은 다음 효과 중 1, 2, 3, 4개, 또는 그 이상의 효과를 달성하기에 충분한 양의 양을 지칭한다: (i) 치료될 질환, 장애 또는 병태 또는 그것과 관련된 증상의 증증도를 감소시키거나 개선한다; (ii) 치료될 질환, 장애 또는 병태, 또는 그것과 관련된 증상의 기간을 감소시킨다; (iii) 치료될 질환, 장애 또는 병태, 또는 그것과 관련된 증상의 진행을 방지한다; (iv) 치료될 질환, 장애 또는 병태, 또는 그것과 관련된 증상의 퇴행을 유발한다; (v) 치료될 질환, 장애 또는 병태, 또는 그것과 관련된 증상의 발생 또는 개시를 방지한다; (vi) 치료될 질환, 장애 또는 병태, 또는 그것과 관련된 증상의 재발을 방지한다; (vii) 치료될 질환, 장애 또는 병태, 또는 그것과 관련된 증상을 가진 대상체의 입원을 감소시킨다; (viii) 치료될 질

환, 장애 또는 병태, 또는 그것과 관련된 증상을 가진 대상체의 입원 기간을 감소시킨다; (ix) 치료될 질환, 장애 또는 병태, 또는 그것과 관련된 증상을 가진 대상체의 생존율을 증가시킨다; (xi) 대상체에서 치료될 질환, 장애 또는 병태, 또는 그것과 관련된 증상을 억제 또는 감소시킨다; 및/또는 (xii) 또 다른 치료법의 예방 또는 치료 효과(들)를 향상시키거나 개선한다.

- [0186] 치료적 유효량 또는 투여량은 다양한 요인, 예컨대 치료될 질환, 장애 또는 병태, 투여 수단, 표적 부위, 대상체의 생리적 상태(예컨대, 성별, 체중, 건강을 포함함), 대상체가 인간 또는 동물인지의 여부, 투여된 다른 약물, 및 치료가 예방적인지 또는 치료적인지의 여부에 따라 달라질 수 있다. 치료 투여량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위하여 최적으로 적정된다.
- [0187] 특정 구체예에 따르면, 본원에 기술된 조성물은 대상체에 대한 의도된 투여 경로에 적합하도록 제제화된다. 예를 들어, 본원에 기술된 조성물은 정맥내, 피하, 또는 근육내 투여에 적합하도록 제제화될 수 있다.
- [0188] 본원에서 사용되는 바, 용어 "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 모두, 반드시 대상체에서 식별할 수 있는 것은 아니지만 대상체에서 식별 가능한 암과 관련된 적어도 하나의 측정 가능한 물리적 매개변수의 개선 또는 반전을 지칭하도록 의도된다. 용어 "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 또한 질환, 장애, 또는 병태의 진행을 퇴행, 예방하는 것을 유발하거나, 또는 적어도 진행을 둔화시키는 것을 지칭할 수 있다. 특정 구체예에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 질환, 장애, 또는 병태, 예컨대 종양 또는 보다 바람직하게는 암과 관련된 하나 이상의 증상의 완화, 증상의 발생 또는 개시의 예방, 또는 증상 기간의 감소를 지칭한다. 특정 구체예에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 질환, 장애, 또는 병태의 재발의 예방을 지칭한다. 특정 구체예에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 질환, 장애, 또는 병태를 가진 대상체의 생존의 증가를 지칭한다. 특정 구체예에서, "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 대상체에서 질환, 장애, 또는 병태의 제거를 지칭한다.
- [0189] 특정 구체예에 따르면, 암의 치료에 사용된 조성물이 제공된다. 암 치료법의 경우, 제공된 조성물은 한정하는 것은 아니지만, 화학요법, 항-CD20 mAb, 항-EGFR mAb, 항-HER-2 mAb, 항-CD19 mAb, 항-CD33 mAb, 항-CD47 mAb, 항-CD73 mAb, 항-PD-1 mAb, 항-PD-L1 mAb, 항-CTLA mAb, 항-TNFR2 mAb, 항-OX40 mAb, 다른 면역-종양학 약물, 항혈관신생제, 방사선 요법, 항체-약물 콘주게이트(ADC), 표적화된 치료법, 다른 항암 약물, 및/또는 한정하는 것은 아니지만 PD1 및 PD-L1을 포함한 면역조절 표적을 표적화하는 치료를 포함한 또 다른 치료와 조합하여 사용될 수 있다. DDR8에 대한 항체는 PD-1, PD-L1, CTLA-4, CTLA, TNFR2, OX40, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD73, CD47, 및/또는 CD3에 대한 파트너 mAb와 이중특이적 항체를 구성하기 위해 사용될 수 있다. CCR8 상의 2개의 상이한 에피토프를 인식하는 2개의 항체는 또한 CCR8을 발현하는 암/종양을 치료하기 위한 이중특이적 항체를 구성하기 위해 사용될 수 있다.
- [0190] 본원에서 사용되는 바, 대상체에 대해 둘 이상의 치료법을 투여하는 맥락에서 용어 "조합하여"는 하나 이상의 치료법의 사용을 지칭한다. 용어 "조합하여"의 사용은 치료법이 대상체에게 투여되는 순서를 제한하지 않는다. 예를 들어, 제1 치료법(예컨대, 본원에 기술된 조성물)은 대상체에게 제2 치료법을 투여하기 전에(예컨대, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 16시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 전), 동시에, 또는 후속하여(예컨대, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 16시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 후)에 투여될 수 있다.
- [0191] 또 다른 일반적인 측면으로, 발명은 대상체에서 CCR8의 수준을 결정하는 방법에 관한 것이다. 방법은 (a) 대상체로부터 샘플을 얻는 단계; (b) 샘플을 발명의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계; 및 (c) 대상체에서 CCR8의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0192] 본원에서 사용되는 바, "샘플"은 대상체로부터 분리된 생물학적 샘플을 지칭하며, 한정하는 것은 아니지만, 전혈, 혈청, 혈장, 혈액 세포, 내피 세포, 조직 생검(예컨대, 암 조직), 림프액, 복수액, 간질액, 골수, 뇌척수액, 타액, 점액, 가래, 땀, 소변, 또는 임의의 다른 분비물, 배설물, 또는 다른 체액이 포함된다. "혈액 샘플"은 혈액 세포, 혈청, 및 혈장을 포함한 전혈 또는 그것의 임의의 분획을 지칭한다. 샘플은, 예를 들어, Treg 세포를 포함할 수 있다.
- [0193] 특정 구체예에서, 대상체에서 CCR8의 수준은 한정하는 것은 아니지만, 웨스턴 블롯 검정, 면역조직화학(IHC) 및 ELISA로부터 선택된 검정을 활용하여 결정될 수 있다. 상대적 단백질 수준은 웨스턴 블롯 및 IHC를 활용함으로써 결정될 수 있고, 절대적 단백질 수준은 ELISA를 활용함으로써 결정될 수 있다. CCR8의 상대적 수준을 결정할

때, CCR8의 수준은 적어도 2개의 샘플 사이에서, 예컨대, 상이한 시점에 동일한 대상체로부터의 샘플 사이에서, 동일한 대상체의 상이한 조직으로부터의 샘플 사이에서, 및/또는 상이한 대상체로부터의 샘플 사이에서 결정될 수 있다. 대안적으로, 예컨대 ELISA에 의해 CCR8의 절대 수준을 결정할 때, 샘플 중의 CCR8의 절대 수준은 샘플을 테스트하기 전에 ELISA에 대한 표준을 생성함으로써 결정될 수 있다. 기술분야에 숙련된 사람은 발명의 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 사용하여 대상체로부터의 샘플 중의 CCR8의 수준을 결정하기 위해 어떤 분석적 기법을 사용할 것인지를 이해할 것이다.

[0194] 대상체로부터의 샘플 중의 CCR8의 수준을 결정하는 방법을 활용하는 것은 질환의 비정상적인(상승된, 감소된, 또는 불충분한) CCR8 수준의 진단으로 이어져서 적절한 치료적 결정을 내리게 한다. 그러한 질환은 암일 수 있다. 추가적으로, 대상체에서 CCR8의 수준을 모니터링함으로써, 위에서 표시된 질환의 발생 위험이 특정 질환에서 및/또는 특정 질환의 진행 중에 CCR8의 수준에 대한 지식을 기반으로 결정될 수 있다.

[0195] **구체예**

[0196] 발명은 또한 다음의 비제한적인 구체예를 제공한다.

[0197] 구체예 1은:

[0198] (1) 각각 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 및 6;

[0199] (2) 각각 서열 번호: 13, 2, 14, 4, 28, 및 6;

[0200] (3) 각각 서열 번호: 13, 2, 15, 4, 5, 및 6;

[0201] (4) 각각 서열 번호: 16, 17, 18, 29, 30, 및 6;

[0202] (5) 각각 서열 번호: 19, 20, 21, 4, 5, 및 6;

[0203] (6) 각각 서열 번호: 22, 23, 24, 31, 5, 및 32; 또는

[0204] (7) 각각 서열 번호: 25, 26, 27, 33, 34, 및 35

[0205] 의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2, HCDR3, 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2, 및 LCDR3을 포함하고,

[0206] 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 CCR8, 바람직하게는 인간 CCR8에 특이적으로 결합하는, 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이다.

[0207] 구체예 2는 서열 번호: 7, 36, 38, 40, 42, 44, 또는 46에 대해 적어도 95% 동일한 폴리펩타이드 서열을 가지는 중쇄 가변 영역, 또는 서열 번호: 8, 37, 39, 41, 43, 45, 또는 47에 대해 적어도 95% 동일한 폴리펩타이드 서열을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 구체예 1의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이다.

[0208] 구체예 3은:

[0209] (1) 서열 번호:7의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:8의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

[0210] (2) 서열 번호:36의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:37의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

[0211] (3) 서열 번호:38의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:39의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

[0212] (4) 서열 번호:40의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:41의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

[0213] (5) 서열 번호:42의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:43의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

[0214] (6) 서열 번호:44의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:45의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는

[0215] (7) 서열 번호:46의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:47의 폴리펩타이드 서열을 갖는

경쇄 가변 영역

- [0216] 을 포함하는 것인, 구체에 1 또는 2의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이다.
- [0217] 구체에 4는 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이 키메라 및/또는 인간 또는 인간화된 것인, 구체에 1-3 중 어느 하나의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이다.
- [0218] 구체에 5는 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이:
- [0219] (1) 각각 서열 번호: 1, 48, 49, 50, 51, 및 6;
- [0220] (2) 각각 서열 번호: 1, 2, 49, 4, 5, 및 6;
- [0221] (3) 각각 서열 번호: 1, 2, 49, 50, 51, 및 6;
- [0222] (4) 각각 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 및 6; 또는
- [0223] (5) 각각 서열 번호: 1, 48, 49, 50, 51, 및 6
- [0224] 의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2, HCDR3, 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 것인, 구체에 4의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이다.
- [0225] 구체에 6은 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이 서열 번호:9, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 또는 60에 대해 적어도 95% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 서열 번호:10, 61, 62, 또는 63에 대해 적어도 95% 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 구체에 5의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이다.
- [0226] 구체에 7은 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이:
- [0227] (1) 서열 번호:9의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- [0228] (2) 서열 번호:52의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:63의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- [0229] (3) 서열 번호:52의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- [0230] (4) 서열 번호:53의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:10의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;
- [0231] (5) 서열 번호:54의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:63의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0232] (6) 서열 번호:59의 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호:62의 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 구체에 6의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이다.
- [0233] 구체에 8은 분리된 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이 항체 의존성 세포의 세포독성(ADCC); 항체 의존성 세포의 식세포작용(ADCP)을 통해 이펙터 매개 중앙 세포 용해를 유도할 수 있고/거나; 콘주게이션된 약물의 모집을 매개할 수 있고/거나; 암 사멸 효과를 가진 또 다른 mAb 또는 그것의 항원 결합 단편과 이중특이적 항체를 형성할 수 있는 것인, 구체에 1-7 중 어느 하나의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이다.
- [0234] 구체에 9는 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이 시노몰구스 CCR8에 특이적으로 결합하는 것인, 구체에 1-8 중 어느 하나의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이다.
- [0235] 구체에 10은 구체에 1-9 중 어느 하나의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 분리된 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이다.
- [0236] 구체에 11은 구체에 1-9 중 어느 하나의 단클론성 항체 또는 항원 결합 단편을 암호화하는 분리된 핵산이다.
- [0237] 구체에 12는 구체에 10의 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 분리된 핵산이다.
- [0238] 구체에 13은 구체에 11 또는 12의 분리된 핵산을 포함하는 벡터이다.

- [0239] 구체예 14는 구체예 13의 백터를 포함하는 숙주 세포이다.
- [0240] 구체예 15는 구체예 1-9 중 어느 하나의 분리된 단클론성 항체 또는 항원 결합 단편 또는 구체예 10의 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 및 제약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 제약학적 조성물이다.
- [0241] 구체예 16은 대상체에게 구체예 15의 제약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 암세포 표면에서 CCR8을 표적화하고/거나, 암을 치료하는 방법이다.
- [0242] 구체예 17은 암이 고행 종양, 바람직하게는 침윤하는 T 세포를 가진 고행 종양, 보다 바람직하게는 침윤하는 T reg 세포를 가진 고행 종양, 보다 바람직하게는 CCR8을 발현하는 고도 억제성 T reg 세포를 가진 고행 종양, 가장 바람직하게는 그것에 대하여 자연 살해(NK) 세포 침윤이 발생한 CCR8을 과다발현하는 침윤하는 고도 억제성 T reg 세포를 가진 고행 종양인 것인, 구체예 16의 방법이다.
- [0243] 구체예 18은 암이 폐암, 두경부암, 식도암, 위암, 대장암, 유방암, 췌장암, 난소암, 신장암, 및 흑색종으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 구체예 16 또는 17의 방법이다.
- [0244] 구체예 19는 대상체가 CCR8 발현 Treg 세포를 포함하는 것인 구체예 16 내지 18 중 어느 하나의 방법이다.
- [0245] 구체예 20은 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산을 포함하는 세포를 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 생성하는 조건 하에서 배양하는 단계 및 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 세포 또는 배양으로부터 회수하는 단계를 포함하는, 구체예 1-9 중 어느 하나의 단클론성 항체 또는 항원 결합 단편 또는 구체예 10의 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편의 제조 방법이다.
- [0246] 구체예 21은 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 제약학적으로 허용 가능한 담체와 조합하여 제약학적 조성물을 얻는 단계를 포함하는, 구체예 1-9 중 어느 하나의 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편 또는 구체예 10의 이중특이적 항체 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 제약학적 조성물을 제조하는 방법이다.
- [0247] 구체예 22는 대상체에서 CCR8의 수준을 결정하는 방법으로서, 방법은:
- [0248] a. 대상체로부터 샘플을 얻는 단계;
- [0249] b. 샘플을 구체예 1-9 중 어느 하나의 분리된 단클론성 항체 또는 그것의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계; 및
- [0250] c. 대상체에서 CCR8의 수준을 결정하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0251] 를 포함하는, 방법.
- [0252] 구체예 23은 샘플이 조직 샘플 또는 혈액 샘플이고, 선택적으로 조직 샘플은 암 조직 샘플인 것인 구체예 22의 방법이다.
- [0253] 구체예 24는 샘플이 Treg 세포를 포함하는 것인 구체예 22의 방법이다.
- [0254] **실시예**
- [0255] **실시예 1: 항체 제조**
- [0256] 면역화:
- [0257] Balb/c 마우스를 4회의 DNA 주사와 이어서 hCCR8 수용체를 발현하는 안정적인 M300.19 세포의 2 내지 4회의 부스트로 면역화함으로써 항-CCR 항체를 발생시켰다. 높은 비역가(> 10,000)를 보이는 마우스를 CelliGo™ 플랫폼에서 단일 B 세포 분류로 처리하였다.
- [0258] CelliGo 플랫폼에 의한 B 세포 분류:
- [0259] 면역화된 마우스로부터의 비장 세포를 X-vivo 15 배지(supplemented by 1% 페니실린/스트렙토마이신, 2x L-글루타민, 10% 낮은 IgG 혈청, 100 ng/mL, IL-2 및 2.5 µg/mL R848)에서 5일 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 시험관내 활성화하였다. B 세포를 Pan B 분리 키트(Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, North-Rhine-Westphalia,

Germany)를 사용하여 풍부하게 하고 Celltrace™ 바이올렛 시약(Thermofisher; Waltham, MA)으로 표지한 후 HiFiBio Celligo 플랫폼(HiFiBio; Cambridge, MA)을 사용하여 분류하였다. 세포 기반 스크리닝 검정을 HiFiBio 미세유체 기술을 사용하여 전개하여 액적의 표적 세포에 결합하는 특이적 B 세포를 검출 및 분류하였다.

[0260] VH/VL을 액적의 단일 B 세포로부터 RT-PCR 및 PCR에 의해 증폭시키고, Absolution HiFiBio 소프트웨어 (HiFiBio)를 사용하여 서열을 분석하였다.

[0261] 키메릭 항체를 인간 IgG1 스캐폴드에서 생성하고 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의해 모세포와 비교하여 CCR8 고복사수 세포(안정적인 CCR8 CHO-K1 세포주, Perkin Elmer; Waltham, MA) 상에서의 특이적 결합에 대해 스크리닝하였다.

[0262] 25개의 특이적 항-hCCR8 항체 중에서, 가변적인 생물학적 특성을 가진 항체의 패널을 확인하였다(도 1-6).

[0263] 항체의 서열을 아래에 제공한다.

**표 1**

항-CCR8 mAb 에 대한 중쇄 가변 영역의 서열.

mAb 클론	VH 서열	서열 번호:
HFB11-10	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAASGFRFNTAMNWVRQAPGKDLEW VARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNVKTEDTAM YYCVRGSDNNYYAMDYWGQGTSTVTVSS	7
HFB11-2	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFSFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSERMLYLQMNNLKTEDTAM YYCVRGGSYSNHYFDYWGQGTTLTVSS	36
HFB11-3	EVQLVESGGGLVQPQGSLLKLSAASGFSFNTYAMNWVRQAPGKGLQW VARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSESMLYLQMNNLKTEDAAM YYCVRGKDANYFYAMDYWGQGTSTVTVSS	38
HFB11-5	EVQLVESGGGLVQPRGSLKLSCTASGFSFNAYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRTKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSESMLYLQMKNLKTEDTAM YYCVRGGYGNGGYFDYWGQGTTLTVSS	40
HFB11-8	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAASGFRFNTAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKSNNYATHYVDSVKDRFTVSRDDSQSMLYLQMNNLKAEDTA MYCVRGSDNNYYAMDYWGQGTSTVTVSS	42
HFB11-19	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTDYIIHWVKQRSGQGLEWIG WFSRNNYVKYNERFTDKATLTADKSSNTVYMELSSLTSEDSAVYFCSR HGRNSIGFAYWGQGTTLTVSA	44
HFB11-21	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFISYWMHWVKQRPGRGLEWI GRIDPNSGKTKYNEKFKTKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSDDSAVYYCA REGWGDYWGQGTTLTVSS	46

[0264]

표 2

항-CCR8 mAb 에 대한 경쇄 가변 영역의 서열.

mAb 클론	VL 서열	서열 번호:
HFB11-10	DIVMTQAAPSPVPTPGESVSISCRSSKLLHSNGNTYLWFLQRPQGS PQLLIYRMSNLAGVPPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQ HLEYPTFGSGTKLEIK	8
HFB11-2	DIVMTQAAPSPVPTPGESVSISCRSSKLLHSNGNTYLWFLQRPQGS PQLLIYQMSNLAGVPPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQ HLEYPTFGAGTKLEIK	37
HFB11-3	DIVMTQAAPSPVPTPGESVSISCRSSKLLHSNGNTYLWFLQRPQGS PQLLIYRMSNLAGVPPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQ HLEYPTFGAGTKLEIK	39
HFB11-5	DIVMTQAAPSVTVTPGESASISCRSSKLLHRNGNSYLWFLQRPQGS PQLLIYRISNLAGVPPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQ LEYPTFGSGTKLEIK	41
HFB11-8	DIVMTQAAPSPVPTPGESVSISCRSSKLLHSNGNTYLWFLQRPQGS PQLLIYRMSNLAGVPPDRFSGSGSGTSFTLRISRVEVEDVGVYYCMQ LEYPTFGSGTKLEIK	43
HFB11-19	DIVMTQAAPSPVPTPGESVSISCRSSKLLNSNGNTYLWFLQRPQGS PQLLIYRMSNLAGVPPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQ HLEYPTYTFGGTKLEIK	45
HFB11-21	DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMHWYQQKPGQPP RLLIYRASNLASGIPARFSGSGSSTDFLTINPVTDDIATYYCQQSNK DPRITFGGGTKLEIK	47

[0265]

표 3

Kabat 및 IMGT 방법에 의해 결정된 항-CCR8 mAb 에 대한 중쇄의 CDR 영역 1-3

VH	HC CDR1	서열 번호:	HC CDR2	서열 번호:	HC CDR3	서열 번호:
HFB11-10	GFRFNTNA	1	IRSKSNNYATY	2	VRGSDNNYYAMDY	3
HFB11-2	GFSFNTYA	13	IRSKSNNYATY	2	VRGGSYYSNHYFDY	14
HFB11-3	GFSFNTYA	13	IRSKSNNYATY	2	VRGKDANYFYAMDY	15
HFB11-5	GFSFNAYA	16	IRTKSNNYATY	17	VRGGYGNGGYFDY	18
HFB11-8	GFRFNTNA	19	IRSKSNNYATH	20	VRGSDNNYYAMDY	21
HFB11-19	GYTFTDYI	22	FSPRNNYVK	23	SRHGRNSIGFAY	24
HFB11-21	GYTFISYW	25	IDPNSGKTK	26	AREGWGDY	27

[0266]

표 4

Kabat 및 IMGT 방법에 의해 결정된 항-CCR8 mAb 에 대한 경쇄의 CDR 영역 1-3

VL	VL CDR1	서열 번호:	VL CDR2	서열 번호:	VL CDR3	서열 번호:
HFB11-10	KSLLSHNGNTY	4	YRMSNL	5	MQHLEYPPT	6
HFB11-2	KSLLSHNGNTY	4	YQMSNL	28	MQHLEYPPT	6
HFB11-3	KSLLSHNGNTY	4	YRMSNL	5	MQHLEYPPT	6
HFB11-5	KSLLRNGNSY	29	YRISNL	30	MQHLEYPPT	6
HFB11-8	KSLLSHNGNTY	4	YRMSNL	5	MQHLEYPPT	6
HFB11-19	KSLLSHNGNTY	31	YRMSNL	5	MQHLEYPPT	32
HFB11-21	ESVDNYGISF	33	YRASNL	34	QQSNKDPRT	35

[0267]

[0268] 실시예 2: CCR8 발현 세포에 특이적으로 결합하는 항-CCR8 단클론성 항체

[0269] 간단히 설명하면, 정제된 항체(PBS에서 30 mM 범위, 3배 희석)를  $1 \times 10^5$ 의 안정적인 CCR8 발현 CHOK1 세포

(Perkin Elmer; Waltham, MA)와 함께 30분 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. MACS 완충액(Miltenyi; Bergisch Gladbach, Germany)에서 세척한 후, 이차 항-인간-AF647 항체(Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA)를 PBS에서 12 nM로 30분 동안 인큐베이션하였다. MACS 완충액에서 세척한 후, 세포 펠릿을 50 µl PBS에 재현탁하고 샘플을 iQue 세포 분석기(Sartorius; Goettingen, Germany) 상에서 Forecyt 소프트웨어(Intellicyt; Ann Arbor, MI)를 사용하여 분석하였다. 단일 세포로부터의 AF647 채널에 대한 형광의 평균을 도 1에 도시한다.

[0270] 모 CHOK1 세포 상에서 신호는 검출되지 않았다; 그러므로, 테스트한 항체는 hCCR8에 특이적이었다(도 1B). 도 1A에 도시된 적정 곡선으로부터 얻어진 EC<sub>50</sub> 값은 0.5 내지 9 nM 범위였다(도 1C).

[0271] 실시예 3: 항-CCR8 단클론성 항체는 N 말단뿐만 아니라 단백질 형태에 관여하는 루프 1을 인식하였다

[0272] CCR8의 에피토프를 지도화하기 위하여, 가장 가까운 케모카인 수용체 CCR4(UniProt/Swiss-Prot: P51679(서열 번호:12))에 융합된 인간 CCR8(UniProt/Swiss-Prot: P51685(서열 번호:11))의 부분을 함유하는 키메릭 단백질을 발현하는 구성물을 생성하였다. 결과적으로 생성된 단백질은 인간 CCR4로부터의 N 말단 도메인(서열 번호:12의 아미노산 1-40), 세포의 도메인 1((ECL1) 서열 번호:12의 아미노산 100-112), 세포의 도메인 2((ECL2) 서열 번호:12의 아미노산 177-205), 또는 세포의 도메인 3((ECL3) 서열 번호:12의 아미노산 269-286)과 인간 CCR8(서열 번호:11)로부터의 나머지 서열을 함유한다. 구성물을 절단 가능한 세포내 GFP 태그를 함유하고 있는 pcDNA3.1 벡터에서 만들었고, 구성물을 일시적으로 ExpiHEK293 세포 표면에서 발현시켰다. 정제된 항체(50 nM)를 인간, 마우스, 또는 cyno CCR8-GFP 단백질로 일시적으로 형질감염된 1x10<sup>5</sup>의 ExpiHEK293 세포와 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 이차 항-인간-AF647 항체(Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA)을 PBS에서 12 nM로 30분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 세포 펠릿을 50 µL PBS에 재현탁하고 샘플을 iQue 세포 분석기(Sartorius, Goettingen, Germany) 상에서 Forecyt 소프트웨어(Intellicyt, Ann Arbor, MI)를 사용하여 분석하였다. 특정 신호에 대한 형광 강도의 평균을 도 2에서 GFP+ 세포 중에 나타낸다.

[0273] 모든 항체는 인간 CCR8에 특이적이었고 가장 가까운 계열 구성원인 CCR4와 교차 반응하지 않았다. 항체는 CCR8/CCR4 돌연변이체에 대해서 유사한 프로파일을 나타냈다. N 말단 도메인을 CCR4로 대체했을 때, 항-CCR8 항체는 반응성을 상실하였다. 결합 활성은 세포의 도메인 1(ECL1)을 대체했을 때 크게 감소하였다. 그러나, 항체의 대부분이 cyno CCR8과 교차반응하지 않았고(도 3) ECL1이 인간 CCR8의 ECL1과 100% 동일하기 때문에, ECL1 루프는 단백질 형태에 중요한 역할을 했지만 항체에 대한 에피토프는 아닐 수 있음을 시사하였다.

[0274] ECL2 및 3의 대체로는 영향이 없었기 때문에, 생성된 항-CCR8 항체는 N 말단 도메인에 위치한 에피토프를 함유한 것으로 결정하였다.

[0275] 실시예 4: 항-CCR8 단클론성 항체는 인간 CCR8 단백질에 특이적이었고 마우스 및/또는 cyno CCR8 수용체와 교차 반응할 수 있다.

[0276] 간단하게 설명하면, 정제된 항체(50 nM의 포화 농도, 도 3A 또는 100 nM 부위의 농도 범위, 3배 희석, 도 3B-3C)를 절단 가능한 링커를 통해 GFP 단백질에 융합된 인간(서열 번호:11; UniProt/Swiss-Prot: P51685), 마우스 CCR8(서열 번호: 64; UniProt/Swiss-Prot: P56484), 또는 cyno CCR8(서열 번호: 65; UniProt/Swiss-Prot: G7NYJ2)로 일시적으로 형질감염된 1x10<sup>5</sup> ExpiHEK293 세포와 함께 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 이차 항-인간-AF647 항체(Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA)를 PBS에서 12 nM로 30분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 세포 펠릿을 50 µL PBS에 재현탁하고 샘플을 iQue 세포 분석기(Sartorius, Goettingen, Germany) 상에서 Forecyt 소프트웨어(Intellicyt, Ann Arbor, MI)를 사용하여 유세포 분석에 의해 분석하였다. GFP+ 세포 중의 특정 신호에 대한 형광 강도의 평균을 도 3A-3C에 나타낸다. 포화 농도에서 테스트한 모든 항체를 도 3A에 도시한다. 마우스 CCR8 및 cyno CCR8에 대한 교차 반응성 항체의 적정 곡선을 각각 도 3B 및 3C에 나타낸다.

[0277] 상이한 교차 반응성 프로파일을 항-CCR8 항체 사이에서 관찰하였다: HFB11-3, HFB11-5, HFB11-8 및 HFB11-10을 포함한 하나의 메인 그룹은 인간 단백질에 대해서만 특이적이었고 다른 종과는 교차 반응하지 않았다. HFB11-2는 마우스CCR8 단백질과 교차 반응하였다; HFB11-19는 cyno CCR8 단백질을 인식하였다; 그리고 HFB11-21은 마우스 및 cyno CCR8 단백질 모두에 결합할 수 있었다. 이들 항체는 N 말단 도메인 중에서 상이한 에피토프를 인식하는 것으로 여겨진다. 마우스 CCR8 항체의 적정 곡선은 HFB11-2에 대해 나노몰 미만의 EC<sub>50</sub>을 갖지만 HFB11-21에 대해서는 53 nM의 EC<sub>50</sub>의 낮은 결합 효능을 가진 유사한 결합 프로파일을 입증하였다(도 3B). 다른 한편으로, 이 항체는 cyno CCR8 수용체에 대해 15.8 nM의 EC<sub>50</sub>으로 더 높은 결합 특성을 입증하였다. HFB11-19는 1.8

nM의 EC<sub>50</sub>으로 cyno CCR8에 대해 더 강력한 결합자이다(도 3C).

[0278] **실시예 5: 항-CCR8 항체는 CCR8 발현 세포에 대한 CCL1 결합을 차단한다**

[0279] 인간 CCR8 발현 세포에 대한 CCL1 결합을 차단하는 능력을 평가하였다. 다양한 농도(100 nM에서 시작하는 희석 범위)의 항-CCR8 항체를 안정적인 CCR8-발현 세포(CHOK1, Perkin Elmer)에 4°C에서 30분 동안 첨가하였다. MACS 완충액에서 세척한 후, 30 nM의 hCCL1-AF647(Almac)을 첨가하고 4°C에서 45분 동안 인큐베이션하였다. MACS 완충액에서 세척한 후, 펠릿화된 세포를 50 µL에 재현탁한 후 iQue 세포 분석기(Sartorius, Goettingen, Germany) 및 Forecyt 소프트웨어(Intellicyt, Ann Arbor, MI)를 사용하여 유세포 분석에 의해 판독하였다. 최대 평균 형광 강도(MFI)를 항체 없이 얻어서 100%의 CCL1 결합을 반영하였다. AF647 채널에 대한 MFI를 사용하여 % CCL1 차단(식=100-(MFI<sub>샘플</sub>\*100/MFI<sub>CCL1 단독</sub>))을 계산하였다. 도 4는 7개 중 5개의 항-CCR8 항체가 CCR8에 대한 CCL1 결합을 차단하는 것을 입증하는 결과를 보여준다.

[0280] cyno와 교차 반응하지 않은 HFB11-19 및 HFB-21은 세포 표면에서 발현된 hCCR8에 대한 hCCL1 결합을 차단할 수 없었던 반면, 다른 항체는 모두 약 0.4 내지 1.4 nM 범위의 IC<sub>50</sub> 값으로 hCCL1을 효과적으로 차단하였다(도 4B). 이것은 HFB11-19 및 HFB11-21이 N 말단 도메인 상에서 다른 항체와 비교하여 상이한 에피토프를 공유하는 것을 시사한다.

[0281] **실시예 6: 항-CCR8 항체는 세포내 Ca<sup>2+</sup> flux플럭스를 억제한다**

[0282] CCR8 저복사수 세포(M300.19 마우스 pre-B 세포)를 100 nM의 HFB11-10 항체(희석 화살표, 도 5D 및 5G), HFB11-3 항체(희석 화살표, 도 5 또는 완충액(도 5E))로 0초 시점에 처리하고, 이어서 90초 동안 인큐베이션하고 1 nM의 CCL1(투명한 화살표, 도 5B-5D) 또는 10 nM의 CCL1(투명한 화살표, 도 5E-5G)을 첨가하였다. 완충액만 있는 음성 대조군은 도 5A에 도시한다(투명한 화살표). 도 5C 및 5D는 두 항체 모두 CCR8-M300.19 세포에서 CCL1 유도 Ca<sup>2+</sup> 스파이크를 간섭하였고, 이때 1 nM CCL에서 완전한 신호 억제가 있음을 입증하였다. 10 nM로 증가된 CCL1 농도로 HFB11-3 및 HFB11-10에 대해 각각 61 및 77.5%의 부분 억제가 관찰되었다(도 5F 및 5G). 또한 CCL1 결합을 차단한 항-CCR8 항체는 케모카인에 의해 유도된 세포내 신호전달을 또한 차단한 것이 입증되었다.

[0283] **실시예 7: 항-CCR8 항체는 항체 의존성 세포의 세포독성(ADCC) 리포터 생물검정에서 CD16과 결합할 수 있었다**

[0284] CCR8 발현 CHOK1 세포(Perkin Elmer)를 ADCC 리포터 생물검정(Promega)에서 표적 세포로서 사용하였다. 간단하게 설명하면, 항-CCR8 항체(30 nM부터의 범위, 3배 희석), 표적 세포(25000/웰)를 CD16 및 루시페라제 리포터 유전자를 발현하는 Jurkat 조작 세포와 함께 E/T=3:1로 공동 배양하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 6시간 인큐베이션한 후, Bio-glo 시약을 첨가하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션한 다음 Tecan 플레이트 판독기를 사용하여 생물발광을 판독하였다. RLU 신호를 그래프로 도시한다(도 6A).

[0285] 모든 항-CCR8 항체는 가변적인 효능으로 CD16과 결합할 수 있었다. 비차단 항체인 HFB11-19 및 HFB11-21은 다른 항체와 비교하여 낮은 효능(더 낮은 E<sub>max</sub> 및 EC<sub>50</sub>)을 보였다. HFB11-2, HFB11-3, HFB11-5, HFB11-8 및 HFB11-10은 0.1 내지 0.3 nM 범위의 EC<sub>50</sub> 값과 >25000과 >40000 RLU 사이의 E<sub>max</sub>로 높은 효능을 보였다(도 6B).

[0286] **실시예 8: 인간화된 항-CCR8 항체는 CCR8 발현 세포에 강력하게 결합한다**

[0287] 정제된 항체(ADCC 향상 형식으로 제조됨)를 1x10<sup>5</sup> hCCR8-CHOK1 안정적인 세포 또는 모 CHOK1 세포(MACS 완충액에서 50 nM부터의 범위, 3배 희석)와 함께 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 이차 항-인간-AF647 항체를 MACS 완충액에서 12 nM로 30분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 세포 펠릿을 50 µL MACS 완충액에 재현탁하고 샘플을 iQue 세포 분석기(Sartorius, Goettingen, Germany) 상에서 Forecyt 소프트웨어(Intellicyt, Ann Arbor, MI)를 사용하여 세포분석에 의해 분석하였다. 게이팅된 단일 세포 중에서 AF647 채널에 대한 형광의 평균을 도 7에 나타낸다.

[0288] 적정 곡선은 인간화된 항-CCR8 항체 후보 모두 아이소타입 항체 없이, 인간화된 변이체 Hz25, Hz28, Hz29, Hz35, Hz37 및 Hz4에 대해 각각 0.40, 0.30, 0.37, 0.21, 0.58 및 0.10 nM의 매우 낮은 EC<sub>50</sub>으로 CCR8 발현 세포에 결합할 수 있었음을 보여주었다(도 7A 및 7B).

[0289] 인간화된 항체 서열을 아래에 제공한다:

표 5

H11-10 mAb 에 대한 인간화된 중쇄 가변 영역의 서열.

VH	VH 서열	서열 번호:
H11-10 VH10	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLE WVARIRSKSNSYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDT AVYYCTRGSDNNYYYAMDYWGQGTITVTVSS	9
H11-10 VH1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFRFNTNAMNWVRQASGKGLE WVGRIRSKSNYYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTED TAVYYCTRGSDNNYYYAMDYWGQGTITVTVSS	52
H11-10 VH2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFRFNTNAMNWVRQASGKDLE WVARIRSKSNYYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDT AVYYCTRGSDNNYYYAMDYWGQGTITVTVSS	53
H11-10 VH3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFRFNTNAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKSNYYATYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCVRGSDNNYYYAMDYWGQGTITVTVSS	54
H11-10 VH4	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFRFNTNAMNWFRQAPGKGLE WVARIRSKSNYYATYYTASVKGRFTISRDKSKIAYLQMNSLKTEDT AVYYCVRGSDNNYYYAMDYWGQGTITVTVSS	55
H11-10 VH5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFRFNTNAMNWVRQAPGQDL EWVARIRSKSNYYATYYSQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED TAVYYCVRGSDNNYYYAMDYWGQGTITVTVSS	56
H11-10 VH6	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAASGFRFNTNAMNWVRQPPGKGLE WVGRIRSKSNYYATYYNPSLKSRTISRDKSKNQFSLKLSVTAADT AVYYCVRGSDNNYYYAMDYWGQGTITVTVSS	57
H11-10 VH8	QVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTASGFRFNTNAMNWVRQPPGKALE WVARIRSKSNYYATYYSTSVKTRLTISKDTSKNQLVLTMTNMDPVDI ATYYCVRGSDNNYYYAMDYWGQGTITVTVSS	58
H11-10 VH9	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFRFNTNAMNWVRQASGKGLE WVGRIRSKSNSYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDT AVYYCTRGSDNNYYYAMDYWGQGTITVTVSS	59
H11-10 VH11	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFRFNTNAMNWVRQAPGKDL EWVARIRSKSNYYATYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCVRGSDNNYYYAMDYWGQGTITVTVSS	60

[0290]

표 6

H11-10 mAb 에 대한 인간화된 경쇄 가변 영역의 서열.

VL	VL 서열	서열 번호:
H11-10 VL1	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNGNTYLYWFLQKPGQSP QLLIYRMSNLRASGVPDFRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHL EYPFTFGQGTKLEIK	10
H11-10 VL2	EIVMTQTPLSLSVTPGEQASISCRSSKSLLSHNGNTYLYWFLQKARPSST LLIYRMSNLRASGVPDFRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLE YPFTFGQGTKLEIK	61
H11-10 VL3	DIQMTQSPSAMSVSVDGDRVTITCRSSKSLLSHNGNTYLYWFQKPGKVP PKLLIYRMSNLRASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSVQPEDVATYYCMQHL EYPFTFGQGTKLEIK	62
H11-10 VL4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRSSKSLLSHNGNTYLYWFQKPGQAP RLLIYRMSNLRASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDVAVYYCMQHLE YPFTFGQGTKLEIK	63

[0291]

표 7

Kabat 및 IMGT 방법에 의해 결정된 인간화된 항-CCR8 에 대한 인간화된 중쇄의 CDR 영역 1-3.

VH	HC CDR1	서열 번호:	HC CDR2	서열 번호:	HC CDR3	서열 번호:
H11-10 VH10	GFRFNT NA	1	IRSKSNSYA TY	48	TRGSDNNYYYYA MDY	49
H11-10 VH1	GFRFNT NA	1	IRSKSNNTY	2	TRGSDNNYYYYA MDY	49
H11-10 VH2	GFRFNT NA	1	IRSKSNNTY	2	TRGSDNNYYYYA MDY	49
H11-10 VH3	GFRFNT NA	1	IRSKSNNTY	2	VRGSDNNYYYYA MDY	3
H11-10 VH4	GFRFNT NA	1	IRSKSNNTY	2	VRGSDNNYYYYA MDY	3
H11-10 VH5	GFRFNT NA	1	IRSKSNNTY	2	VRGSDNNYYYYA MDY	3
H11-10 VH6	GFRFNT NA	1	IRSKSNNTY	2	VRGSDNNYYYYA MDY	3
H11-10 VH8	GFRFNT NA	1	IRSKSNNTY	2	VRGSDNNYYYYA MDY	3
H11-10 VH9	GFRFNT NA	1	IRSKSNSYA TY	48	TRGSDNNYYYYA MDY	49
H11-10 VH11	GFRFNT NA	1	IRSKSNNTY	2	VRGSDNNYYYYA MDY	3

[0292]

표 8

Kabat 및 IMGT 방법에 의해 결정된 인간화된 항-CCR8 에 대한 인간화된 경쇄의 CDR 영역 1-3.

VL	VL CDR1	서열 번호:	VL CDR2	서열 번호:	VL CDR3	서열 번호:
H11-10 VL1	QSLLSHNGNTY	50	YRMSNR	51	MQHLEYPFT	6
H11-10 VL2	KSLLSHNGNTY	4	YRMSNL	5	MQHLEYPFT	6
H11-10 VL3	KSLLSHNGNTY	4	YRMSNL	5	MQHLEYPFT	6
H11-10 VL4	KSLLSHNGNTY	4	YRMSNL	5	MQHLEYPFT	6

[0293]

[0294] 실시예 9: 인간화된 항-CCR8 항체는 CCR8에 대한 CCL1 결합을 차단하였다

[0295]  $1 \times 10^5$  안정적인 CHOK1.hCCR8 세포(Perkin Elmer)를 다양한 인간화된 항-CCR8 항체(ADCC 향상 형식으로 제조됨) 또는 아이소타입 항체(33 nM로부터의 농도 범위, 3배 희석)와 함께 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 3분 동안 300 g에서 원심분리한 후, 세포를 AF647(50  $\mu$ L)(Almac)로 표지된 30 nM의 인간 CCL1 리간드와 함께 4°C에서 45분 동안 재현탁하였다. 2회 세척한 후, 세포를 iQue 세포 분석기(Sartorius, Goettingen, Germany)를 사용하는 유세포 분석에 의해 Forecyt 소프트웨어(Intellicyt, Ann Arbor, MI)를 사용하여 분석하였다. % 차단을 실시예 5에서 기술한 것과 같이 계산하고 도 8에 나타냈다.

[0296] ADCC 향상 형식의 인간화된 항-CCR8 항체는 HFB11-10Hz4, HFB11-10Hz25, HFB11-10Hz28, HFB11-10Hz29, HFB11-10Hz35 및 HFB11-10Hz37 항체에 대해 각각 0.09, 1.09, 0.39, 0.68, 0.49 및 0.81 nM의 강력한 IC<sub>50</sub>으로 CCR8 발현 세포에 대한 인간 CCL1 결합을 차단할 수 있었다(도 8).

[0297] 실시예 10: 인간화된 HFB11-10Hz37 항-CCR8 항체는 ADCC 리포터 검정에서 CD16 F 및 V 알로타입과 결합하였다

[0298] 안정적인 hCCR8-CHOK1 세포(Perkin Elmer)를 표적 세포로서 사용하여 ADCC 레포트 생물검정 키트로부터 CD16(FF 또는 VV 표현형) 및 리포터 NFAT 유전자를 발현하는 조작된 안정적인 Jurkat 세포(Promega)와 함께 3:1의 E/T 비율로 공동배양하였다. 다양한 HFB11-10Hz37 항체를 30 nM부터(3배 연속 희석) 또한 배양에 첨가하

였다. 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 6시간 인큐베이션한 후, BioGlo 루시페라제 기질을 공급자 권고를 따라 첨가하고 5분 동안 인큐베이션 한 후 Tecan 플레이트 판독기를 사용하여 발광 신호를 판독하였다. 생물발광 신호는 그래프에서 RLU로서 기록한다(도 9).

[0299] 인간화된 항-hCCR8 항체는 ADCC 리포터 검정에서 표적 세포 사멸을 매개하는 CD16 F 및 V 알로타입 모두에 결합할 수 있었다. 예상과 같이, 고친화성 Fc $\gamma$  수용체(VV 알로타입)로 더 높은 효능을 0.014 nM의 EC<sub>50</sub>으로 관찰하였고, 이것은 저친화성 Fc $\gamma$  수용체(FF 알로타입)로 0.080 nM까지 증가하였다(도 9).

[0300] **실시예 11: 저복사수의 CCR8을 발현하는 세포 상에서 인간화된 항-CCR8 항체 매개 ADCC**

[0301] NK 세포를 NK 세포 분리 키트(Miltenyi)를 사용하여 건강한 인간 PBMC로부터 분리하였다. 24웰 플레이트에서 웰 당 2백만개의 NK 세포를 IL2 RPMI 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 약 30시간 동안 활성화하였다.

[0302] 저복사수의 CCR8을 발현하는 세포(안정적으로 형질감염된 M300.19-마우스 pre-B 세포)를 Celltrace™ FarRed(Invitrogen; Waltham, MA)로 표지한 후 NK 세포(E:T 비율 2:1) 및 다양한 HFB11-10 항체 농도(ADCC 항상 형식으로 인간화된 및 비인간화된)와 함께 16시간 동안 37°C에서 U자형 바닥 96웰 플레이트에서 공동 배양하였다. 죽은 세포를 Nucgreen으로 표지한 후 사이토플렉스 세포 분석기(Beckman Coulter)를 사용하여 형광을 판독하였다. 죽은 표적 세포의 백분율을 이중 양성 세포로서 평가하고 특정 표적 세포 용해의 백분율을 (항체가 있는 표적 죽은 세포 % - 항체가 없는 표적 죽은 세포 %) x 100/(항체가 없는 100% 표적 죽은 세포)로서 평가하였다. 자발적인 세포 사멸을 항체 없이 NK 세포와의 표적 세포 공동 배양 조건에서 평가하였다.

[0303] 도 10은 인간화된 항-CCR8 항체에 의해 매개된 특정 ADCC NK 사멸을 도시한다. 인간화된 변이체 및 모 항체(ADCC 항상 형식임)는 검정(E:T 비율은 3:1)에서 CCR8 발현 저복사수 세포의 ADCC NK 사멸을 매개하는 높은 효능을 입증하였다. EC<sub>50</sub>은 낮았고, 0.003 nM(Hz29, Hz35, 모 Ab에 대해) 내지 Hz25 항체에 대해 0.007 nM의 범위였다(n=3의 공여체로부터의 평균). 모든 인간화된 항체는 일차 NK 세포를 사용하여 ADCC 검정에서 매우 강력한 활성을 입증하였다.

[0304] **실시예 12: 인간화된 항-CCR8 항체 HFB101110의 시험관내 특성화**

[0305] HFB11-10과 관련된, 아프코실화된 인간화된 항-CCR8 항체 HFB101110을 한층 더 연구하였다. 다음의 실시예에서, 항-CCR8 항체 HFB101110 및 HFB11-10을 교대로 사용할 수 있다.

[0306] 도 11A-11G에서 예시된 것과 같이, 항-CCR8 mAb HFB101110을 한층 더 상세하게 평가하였다. 유세포 분석에 의해 측정된 바, 항체는 고복사수(CHOK1-hCCR8, 약 30,000 수용체/세포, 좌측) 및 저복사수(M300.19-hCCR8, 약 2,000 수용체/세포, 우측) 세포 모두에서 각각 0.23 nM 및 0.26 nM의 EC<sub>50</sub>으로 CCR8에 강력하게 결합하는 것이 확인되었다(도 11A). ADCC 활성을 향상시키기 위하여 Fc 영역에 정상적인 글리코실화 및 DE 돌연변이를 가진 hIgG1 항체로서 포매팅된 HFB101110에 대한 모 항체(HFB101110-hIgG1-DE)를 아프코실화된 HFB101110에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다. HFB101110은 유사한 nM 미만의 EC<sub>50</sub> 값으로 고복사수 및 저복사수 hCCR8-발현 세포 모두에 결합할 수 있었다.

[0307] 항-CCR8 mAb HFB101110은 M300.19-hCCR8 세포에 대해 ADCC 활성을 유도하였다. PBMC로부터 분리된 외인성 일차 NK 세포를 3:1의 이펙터:표적 비율로 첨가하고, 죽은 세포를 공동 배양 후 16시간 후에 유세포 분석에 의해 NucGreen 염색을 사용하여 정량화하였다. 3개의 상이한 공여체로부터의 NK 세포를 사용하는 실험의 평균 값을 도시한다. HFB101110-hIgG1-DE 및 또 다른 항-hCCR8 DE 포매팅된 hIgG1 항체를 비교기로서 사용하였다(도 11B).

[0308] 관련된 케모카인 수용체 CCR4에 대한 HFB101110의 결합을 유세포 분석에 의해 평가하였고, 여기서 항-CCR4 항체 모가물리주맴을 양성 대조군으로서 사용하였다. HFB101110은 hCCR4에 대한 결합을 보이지 않았고, 이것은 이 항체에 의한 hCCR8의 특이한 인식을 나타낸다(도 11C).

[0309] 도메인 교환 실험을 수행하여 HFB101110에 의해 인식된 CCR8의 영역을 확인하였다. hCCR8의 부분을 관련된 케모카인 수용체 CCR4의 상동성 도메인으로 교체하고, 결과적으로 생성된 키메라 단백질을 293 세포에서 발현시키고 HFB101110의 결합을 유세포 분석에 의해 평가하였다(도 11D). 이들 실험을 기반으로, HFB101110은 hCCR8의 N 말단 세포의 도메인을 인식하는 것으로 결정되었다.

[0310] 도 11E에서 나타낸 것과 같이, HFB101110에 의한 hCCR8에 대한 hCCL1 결합의 차단을 유세포 분석에 의해 측정하

였다. 재조합 hCCL1에 의해 유도된 CCR8+ 세포의 화학주성의 HFB101110 매개 차단을 트랜스웰 이동 분석에 의해 측정하였다. CCL1은 존재하는 항체의 양을 다르게 하여도 30 nM의 농도로 존재하였다. HFB101110-hIgG1-DE뿐만 아니라 또 다른 인간화된 변이체를 비교기로서 사용하였다(도 11F).

[0311] 도 11G에서 나타난 것과 같이, hCCL1의 CCR8+ 세포에의 첨가에 의해 유도된 칼슘 플럭스의 HFB101110 매개 차단을 평가하였다. 10 nM hCCL1을 화살표로 표시된 시간에, 10 ug/mL HFB101110의 존재 또는 부재 하에 CCR8+ 세포에 첨가하였다.

[0312] 실시예 13: 인간화된 항-CCR8 항체는 항체 의존성 세포의 식세포작용(ADCP) 활성을 입증하였다

[0313] 일차 대식세포를 CD14+ 비드 분리 후 인간 PBMC로부터 분리하였다(Miltenyi). 2 M 세포/웰을 혈청 유리 RPMI 1640 배지가 들어있는 6웰 플레이트에 37°C, 5%CO<sub>2</sub>에서 1시간 동안 시딩하였다. 그런 후 배지를 활성화 배지(RPMI 1640, 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 50 ng/mL M-CSF)로 대체하고 1주 동안 2일마다 새롭게 교체하였다. IL13을 활성화의 마지막 2일 동안 활성화 배지에 첨가하였다. 표적 세포(안정적인 hCCR8.M300.19 세포)를 Celltrace™ 바이올렛(Invitrogen)으로 표지하였다(37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 20분 인큐베이션). 완전 배지로 세척한 후, CCR8 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 포화 농도(100 nM)의 인간화된 항-CCR8 항체와 함께 인큐베이션한 후, 4시간 동안 활성화된 대식세포와 함께 공동 배양하였다. 대식세포를 항-CD11b-APC 항체(Biolegend)로 염색한 후 유세포 분석에 의해 Cytoflex 세포 분석기(Beckman Coulter)를 사용하여 분석하였다. 식세포작용 세포를 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 이중 양성 세포로서 확인하였다.

[0314] 도 12에서 나타난 것과 같이, 약 15%의 세포가 4시간 인큐베이션 후에 대식세포에 의해 식세포되었거나 식세포작용 과정을 받았다(도 12). 인간화된 항-CCR8 항체 HFB11-10Hz37은 일차 대식세포 세포를 사용하여 ADCP를 통해 특이적으로 CCR8+ 세포 식세포작용을 매개하였다.

[0315] 실시예 14: hCCR8-KI 마우스에서 인간화된 항-CCR8 항체 매개된 MC38 세포에 대한 항종양 활성

[0316] 마우스 및 종양 세포주:

[0317] 생후 8주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 Biocytogen Jiangsu Co., Ltd(Jiangsu, China)로부터 구입하였다. MC38 마우스 결장 암종 세포주를 생체내 종양 효능 연구에 사용하였다(Biocytogen Jiangsu Co., Ltd.) MC38 세포주를 기술된 모든 종양 실험에 대해 저장하기 전에 2회 계대시키고, 해동하고, 2회 계대시킨 후 이식하였다. 세포를 미코플라스마(*Mycoplasma*)가 없는 것으로 결정하였다.

[0318] 연구를 실험동물 관리 평가 및 인증 협회(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care(AAALAC))에 의한 안내에 따라 바이오사이토젠(Biocytogen) 동물기관사용위원회(IACUC)에 의해 검토되고 승인된 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0319] hCCR8 KI C57BL/6 마우스(생후 8주령, 15-21 그램)를 0.1 mL PBS 중의 MC38 종양 세포( $5 \times 10^5$ )로 우측 전면 옆구리에 피하 주사하였다. 종양 이식 후 1주 후에, 10 mg/kg의 인간화된 HFB11-10 또는 아이소타입 항체를 3주 동안 격주로 복강내로 주사하였다(n = 8마리/그룹). 종양 부피(mm<sup>3</sup>) 및 체중을 주 2회 측정하였다(도 13A 참고, 이 도면은 hCCR8 녹인 마우스에서 생체내 효능 연구를 개략적으로 도시함). 이 연구를 위해, mIgG2a 항체로서 포매팅된 HFB101110의 비아뷰코실화 버전을 사용하여 마우스 Fc 수용체와의 결합을 용이하게 하였다.

[0320] 도 13B-13D는 hCCR8-KI 마우스에서 대장암으로부터 유래된 MC38 세포를 사용하여 인간화된 항-CCR8 항체(도 13C-13D) 또는 아이소타입 mIgG2a(도 13B-13D)의 투여에 의해 항종양 활성을 평가한 것을 도시한다. 치료를 시작한 후 9일 후부터 시작하여, 종양 성장은 아이소타입 대조군에 비교하여 항-인간 CCR8 치료된 그룹에서 유의미하게 감소하였다(p<0.01, \*\*). 나아가, 8마리 마우스 중 3마리에서 종양 이식 후 11일째부터 종양 퇴행이 관찰되었다. 종합적으로, 이들 결과는 항-CCR8 항체가 종양 성장을 상당히 감소시켰음을 입증하였다.

[0321] 실시예 15: 인간화된 항-CCR8 항체 요법은 종양 미세환경을 재프로그래밍하였다

[0322] 작용 메커니즘을 더 낮게 정의하기 위하여, 항-CCR8 항체 요법에 의해 유도된 MC38 종양 미세환경(TME)의 변화를 조사하였다. 도 14A-14F에서 나타난 것과 같이, 항-CCR8 항체 치료는 치료된 마우스에서 종양 침윤 림프구(TIL) 조성을 변경시켰다.

[0323] 항-CCR8 항체 투여가 종양 침윤 CD8+의 백분율을 상당히 증가시킨 것으로 관찰되었다(\*, p 값 = 0.0262, 도

14C). 더욱이, CD8/Treg 비율의 상당한 증가가 관찰되었고(\*, p 값 = 0.0240, 도 14D), 이것은 항종양 면역에 유리하게 면역 균형이 기울어진 것을 추가로 시사한다. 치료는 또한 TME에서 NK 세포 및 CD4+ 이펙터 T 세포의 백분율을 상당히 증가시켰다(각각 도 14E 및 14B).

[0324] 추가적으로, 항-CCR8 항체 치료는 말단 종점에서 Foxp3+CD4+를 유의미하게 감소시키지 못하였지만(도 14A), 항-CCR8 항체 치료는 CCR8+ Treg 집단을 상당히 감소시켰고(도 14F), 이것은 이 작용제의 표적 특이적 효과를 입증한다. 아이소타입 그룹과 비교하여 관찰된 58% CCR8+ Treg의 감소는 FAC 패널에서 사용된 인간화된 항체에 의한 표적 점유가 동일한 에피토프에 대해 경합한 것을 반영하였다.

[0325] **실시예 16: 신장 세포암(RCC) 환자 및 폐암 환자로부터의 인간 원발성 종양으로부터의 T 세포 집단에서의 CCR8 발현**

[0326] 신선한 종양 침윤 림프구를 소화시켜서 단일 세포 현탁액으로 분리하고, 계수하여 냉동시킨 후 분석하였다. 간단하게 설명하면, 부드러운 MACS 종양 분리 키트(Miltenyi)를 먼저 사용하였다. 종양을 작은 조각으로 절단하여 효소 혼합물과 함께 인큐베이션하고 부드러운 MACS(Miltenyi)를 사용하여 조직을 소화시켰다. 그런 후 샘플을 300 g에서 5분 동안 원심분리하고 10 mL의 저온 배지로 2회 세척하였다. 그런 후 샘플을 30 μM 하에 여과하고 저온 냉동 배지(90% FBS 및 10% DMSO)에 재현탁한 후 추가로 분석하였다. 하나의 분취액을 해동하여 CCR8 표현형에 대한 항체 패널과 함께 인큐베이션하였다. 그런 후, 항-CD45, 항-CD3, 항-CD4, 항-CD8, 항-CD56, 항-TIGIT 항체(Biolegend) 및 항-CCR8(BD)로의 세포의 염색을 수행하였다. 마지막으로, 샘플을 투과시키고 세포내 염색을 위해 FoxP3으로 염색하였다. 샘플을 FLOWJO 소프트웨어를 사용하여 유세포 분석에 의해 분석하였다.

[0327] CCR8 발현을 신장 세포 암 환자(n=13명)의 55-95%로부터 Treg 상에서 관찰하였고, 평균 72.8 ± 12.8%였다(도 15A). 역으로, CCR8 발현 on FoxP3-CD4+ T 이펙터 세포 상에서의 CCR8 발현은 20% 미만이었다(평균 7.9 ± 5.6%) CD8+ T 세포의 경우 0에 가까웠다(평균 1.2 ± 0.8%, 도 14A). 도 15B에 도시된 히스토그램에서, 세포분석 데이터를 공여체 #726에 대해 기록하였는데, Treg의 96%가 감소하였다. CCR8은 RCC 종양 내에서 다른 T 세포 집단에 영향을 주지 않으면서 Treg의 고갈에 대한 관심의 표적인 것으로 확인되었다.

[0328] **실시예 17: 건강한 PBMC 및 악성 PBMC에서 순환으로부터의 T 세포 집단에서 CCR8 발현.**

[0329] CCR8 표현형 분류를 실시예 15에서 기술한 것과 같이 수행하였다. 간단하게 설명하면, 건강한(n=4명) 또는 악성(n=5명) 공여체로부터 PBMC를 신선한 혈액으로부터 분리하였다. 1/3 부피의 피콜(Ficoll)을 혈액 샘플에 첨가한 후 2000 rpm에서 30분 동안 실온에서 원심분리하였다. 백색 고리 함유 면역 세포를 수집하여 PBS로 2회 세척하고 1250 rpm에서 10분 동안 실온에서 원심분리한 후 FACS 분석하였다. T 세포 집단 중에서 CCR8+의 백분율을 도 16에 나타낸다.

[0330] 건강한 또는 악성 환자의 순환에서 관찰된 CCR8 발현은 모든 T 세포 집단에 대해 매우 낮았다(<4%)(도 16). Treg 또는 T<sub>eff</sub>와 CD8+ T 세포 사이에 차이는 없다. 이 분석은 종양 부위로 제한된 표적의 특이성을 확인시켜주며 본 발명자들은 순환에서 부작용을 예상하지 않아 독성 및 자가면역의 위험이 제한된다.

[0331] **실시예 18: 인간화된 항-CCR8 항체는 RCC 환자로부터의 원발성 인간 종양 침윤 림프구(TIL)에 대한 ADCC NK 사멸 활성을 매개하였다**

[0332] 도 17A는 HFB101110에 의해 매개된 원발성 종양 침윤 림프구의 생체의 사멸에 대해 수행된 샘플 수집 및 ADCC 검정의 개략도를 도시한다. RCC 환자(n=13명)로부터의 종양 침윤 림프구의 단일 세포 현탁액을 해동하고 생존성을 카운테스 II 장치 상에서 AO/PI 형광을 사용하여 평가하였다. TIL을 ADCC NK 사멸 검정을 위해 96웰 U자 바닥 플레이트에 100 μL/웰로 나누었다. 50 μL의 항체를 TIL에 첨가한 후, 동종의 일차 NK 세포를 20:1의 E/T 비율로 첨가하였다.

[0333] 건강한 공여체로부터의 NK 세포는 Miltenyi NK 분리 및 팽창 키트를 사용하여 이전에 팽창시켰다. 분취액을 해동시키고 TIL을 제조할 때까지 TIL 배지에 10<sup>7</sup> 세포/mL로 37°C에서 보관하였다. 실험에 필요한 NK 세포의 양을 표현형 분류 실험 중에 이전에 평가된 표적 세포(Treg)의 수를 기반으로 계산하였다. 최종 부피를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서의 24시간 공동 배양 전에 200 mL로 조정하였다. FACS 염색을 실시예 15에서 기술한 것과 같이 면역 세포 집단을 확인하기 위해 수행하였다. 샘플을 유세포 분석에 의해 FLOWJO 소프트웨어를 사용하여 분석하였다: B 세포는 살아있는+/CD45+/CD19+로서 게이팅되었고; CD8+ 세포는 살아있는+/CD45+/CD3+/CD8+로서 게이팅되었으며; T<sub>eff</sub> 세포는 살아있는+/CD45+/CD3+/CD4+/FoxP3-로서 게이팅되었고 Treg은 살아있는+/CD45+/CD3+/CD4+/FoxP3+/TIGIT+로서 게이팅되었다. 통계학적 분석을 일원변량분석을 사용하여 수행하였다

(\*\*\*\* p<0.0001, \*\*\* p<0.001, \*\* p<0.01, \* p<0.05).

- [0334] 아이소타입 그룹과 비교하여 강력한 Treg 감소(CD3+의 %로서)를 관찰하였다(50% 내지 90%, 평균  $71.3 \pm 13\%$ ,  $p < 0.0001$ )(도 17B). 이 집단은 도 17C에서 한 명의 대표적인 환자의 돛트 플롯에서 사라졌다. 이런 고갈은 도 17B에서 나타낸 것과 같이 다른 세포 집단에 대해서는 감소가 관찰되지 않았기 때문에 FoxP3+ CD4+T 세포 (Treg)에 대해 특이적이었다. 역으로, CD8+ 세포의 상당한 증가가 관찰되었다(CD3+ 세포의 CD8+, 평균  $+9.8 \pm 9\%$ ,  $**p=0.0067$ ). 나아가, B 세포 집단은 치료된 그룹에서  $+16.7 \pm 19.6\%$ 로 상당히 증가하였다( $p < 0.0317$ ). 항-CCR8 항체는 생체외에서 특이적 Treg 고갈에 의해 TME를 조절할 수 있었고 RCC 환자로부터의 TIL에서 CD8+ T-세포 및 B-세포를 증가시킴으로써 항종양 면역을 복원시킬 수 있었다.
- [0335] 도 17D에서 추가로 도시된 것과 같이, 원발성 종양 침윤 림프구(TIL)와 일차 NK 세포의 20:1의 이펙터:표적 비율에서의 밤샘 공동 배양 후에 Treg의 고갈을 용량 반응 실험으로 평가하였다. 나머지 세포를 유세포 분석에 의해 정량화하였다. ADCC 검정에서 첨가된 외인성 NK 세포의 양의 함수로서 Treg의 고갈을 또한 평가하였다(도 17E). 프로파일링한 9개의 샘플 중 2개가 외인성 NK 세포의 부재 하에서도 실질적인 Treg 고갈을 보였고, 이것은 종양 샘플에 존재하는 외인성 NK 세포가 ADCC를 매개할 수 있음을 시사한다.
- [0336] 실시예 19: 안전성 및 약동학 평가
- [0337] HFB101110의 약동학 및 안전성 연구를 시노몰구스 원숭이에서 수행하였다(개략적인 단일 용량 PK 연구에 대해서는 도 18A 참고).
- [0338] 시노몰구스 원숭이에서 HFB101110의 혈청 PK 프로파일은 15일 후에 항약물 항체가 검출되지 않았고(도 18B 참고), 가용성 항체 형식을 사용하는 인간 PBMC로부터의 시험관내 사이토카인 방출 연구에서 유의할만한 사이토카인 방출이 관찰되지 않았음(도 18C 참고)을 나타냈다.

## [0339] 참고문헌

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

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

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

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

Bhatt, D., Kang, B., Sawant, D., Zheng, L., Perez, K., Huang, Z., Sekirov, L., Wolak, D., Huang, J. Y., Liu, X., DeVoss, J., Manzanillo, P. S., Pierce, N., Zhang, Z., Symons, A. & Ouyang, W. (2021) STARTRAC analyses of scRNAseq data from tumor models reveal T cell dynamics and therapeutic targets, *J Exp Med.* **218**. e2020132.

## [0340]

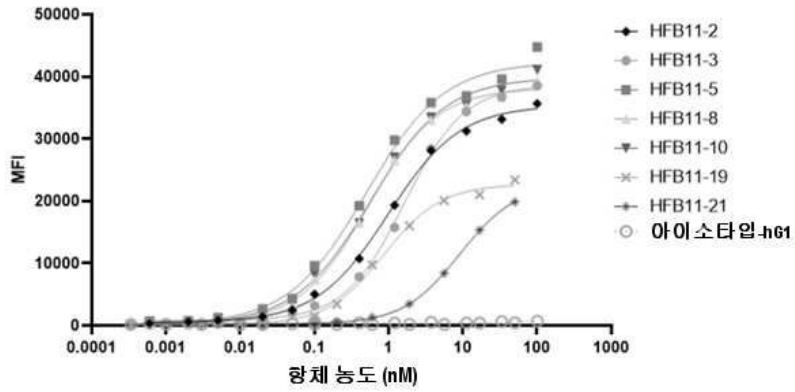
## [0341]

기술분야에 숙련된 사람들은 위에서 기술된 구체예에 대해 그것의 광범위한 발명의 개념으로부터 벗어나지 않으면서 변화가 만들어질 수 있음을 인정할 것이다. 그러므로, 본 발명은 개시된 특정 구체예에 제한되지 않지만, 본 설명에 의해 정의된 본 발명의 사상 및 범주 내에 있는 변형을 포함하는 것으로 의도되는 것이 이해된다.

도면

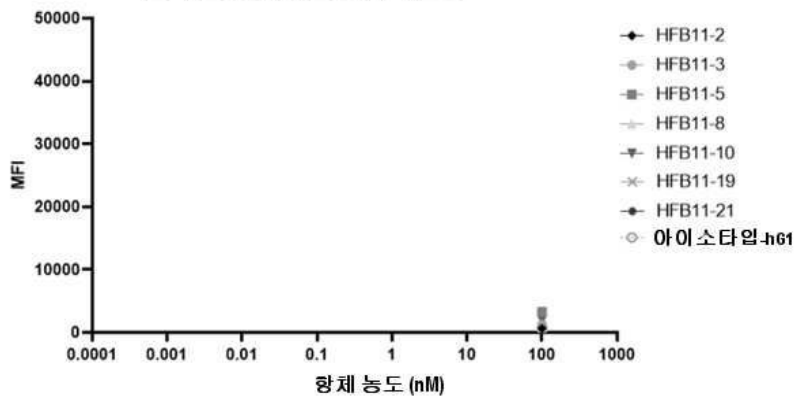
도면1ac

CCR8.CHO 세포 상에서 모 항체의 결합



도 1A

모 세포 상에서 모 항체의 결합

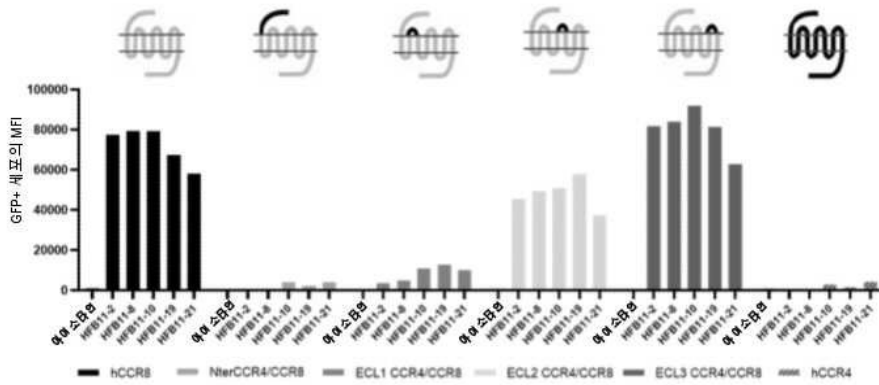


도 1B

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

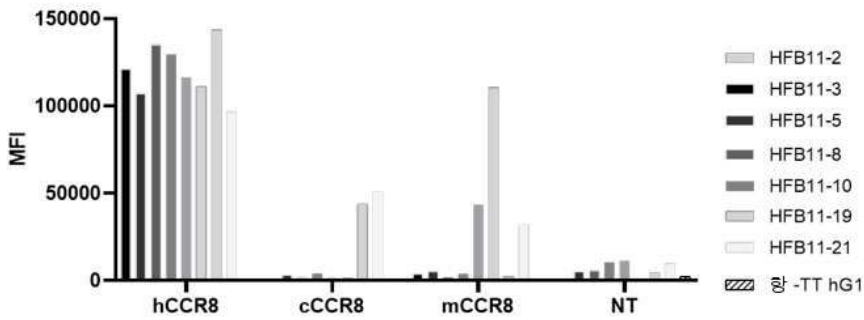
도 1C

도면2

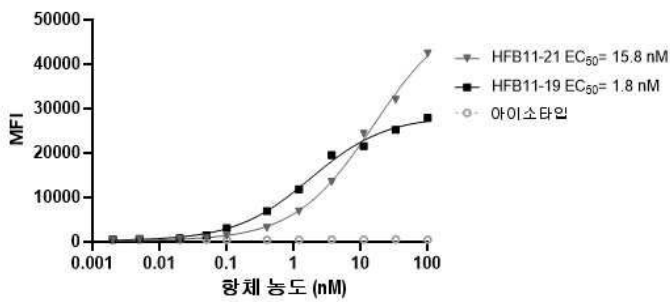


도 2

도면3ab

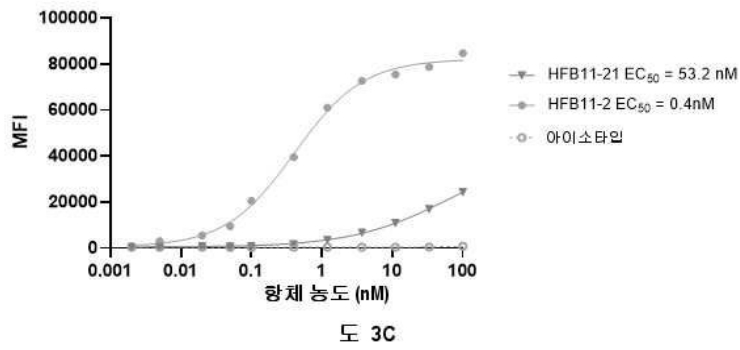


도 3A

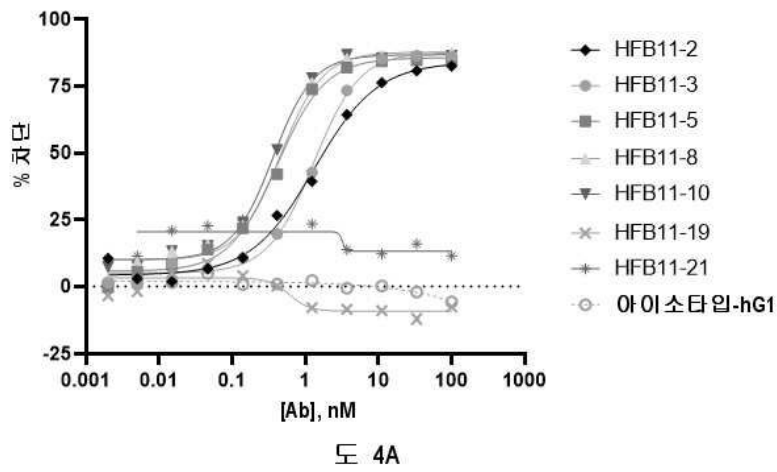


도 3B

도면3c



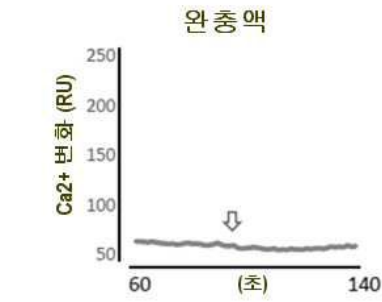
도면4ab



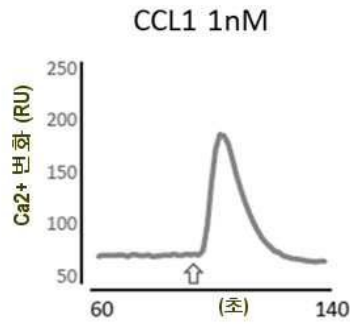
	HFB11-2	HFB11-3	HFB11-5	HFB11-8	HFB11-10	HFB11-19	HFB11-21
IC50 (nM)	1.326	1.303	0.413	0.452	0.428	n.a.	n.a.

도 4B

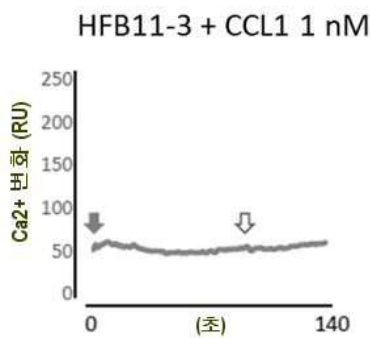
도면5af



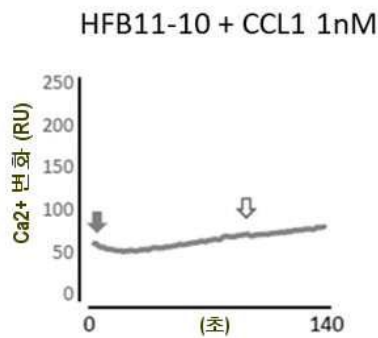
도 5A



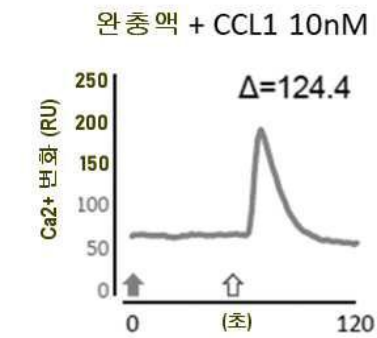
도 5B



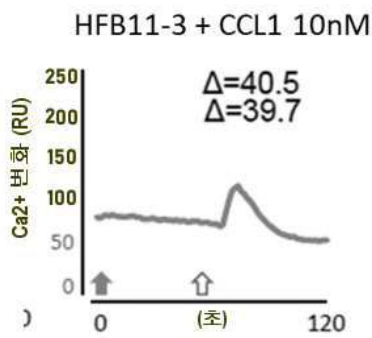
도 5C



도 5D

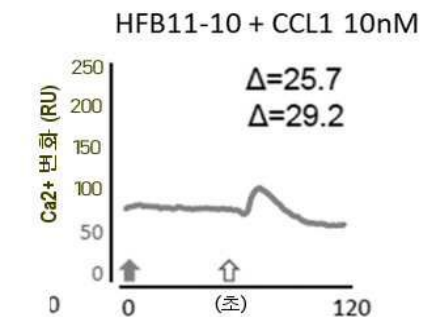


도 5E



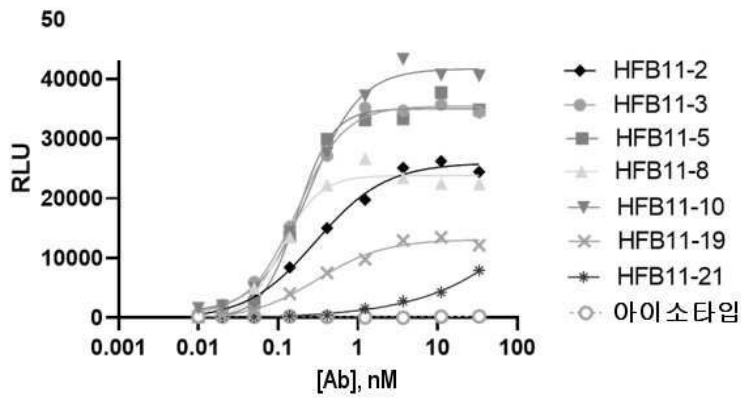
도 5F

도면5g



도 5G

도면6ab

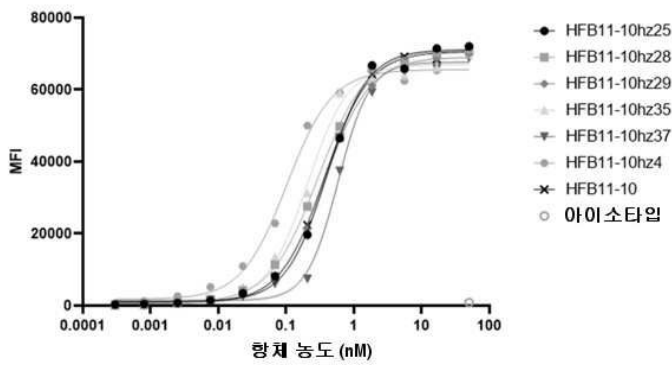


도 6A

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

도 6B

도면7ab

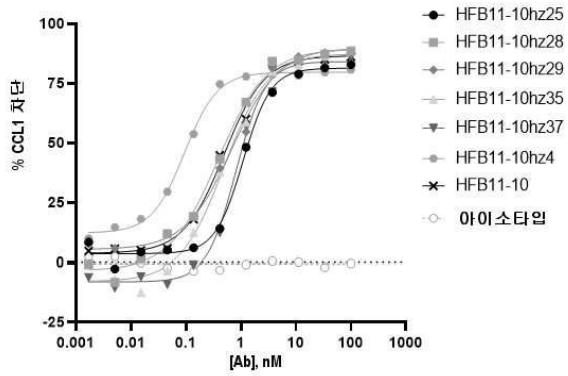


도 7A

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

도 7B

도면8ab

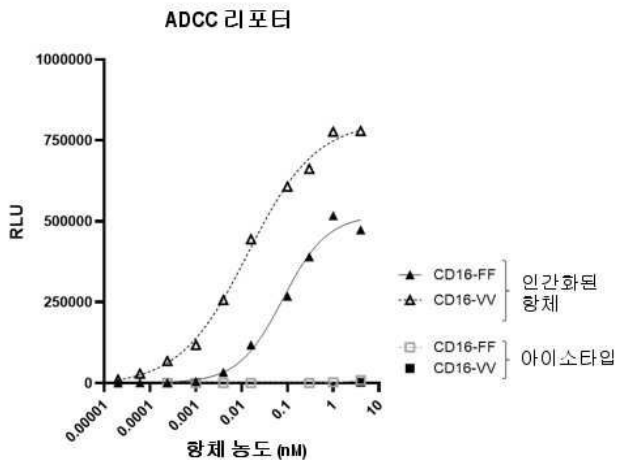


도 8A

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

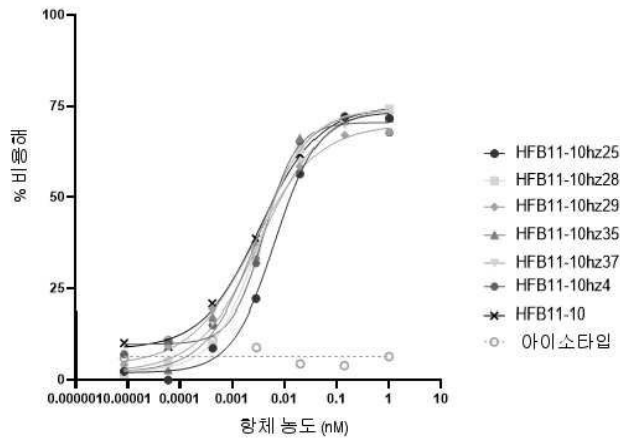
도 8B

도면9



도 9

도면10ab

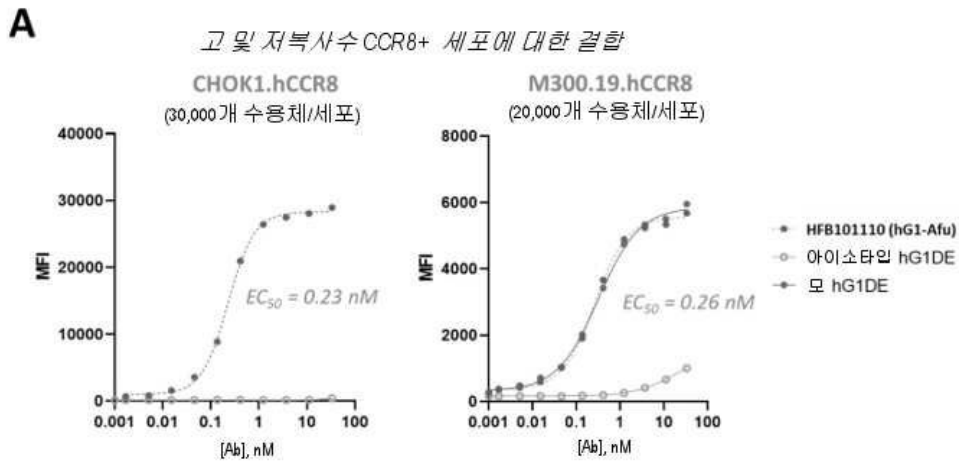


도 10A

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

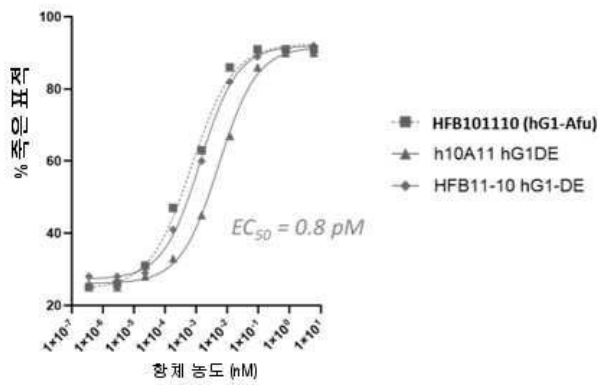
도 10B

도면11ab



도 11A

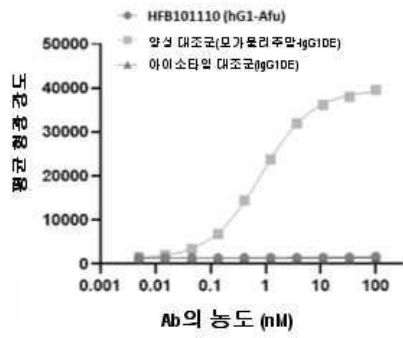
**B** 저복사수(약 2,000개 수용체/세포) M300.19-hCCR8 세포에 대한 ADCC 활성



도 11B

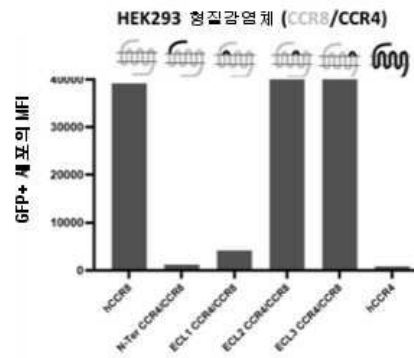
도면11ce

**C** hCCR4보다 위의 hCCR8에 대한 특이성



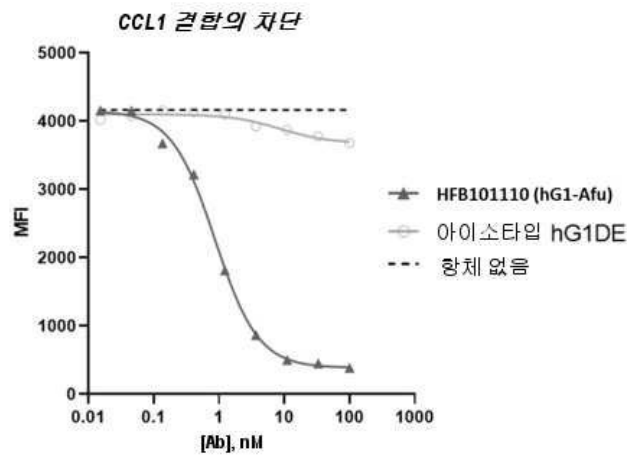
도 11C

**D** 에피토프 지도화



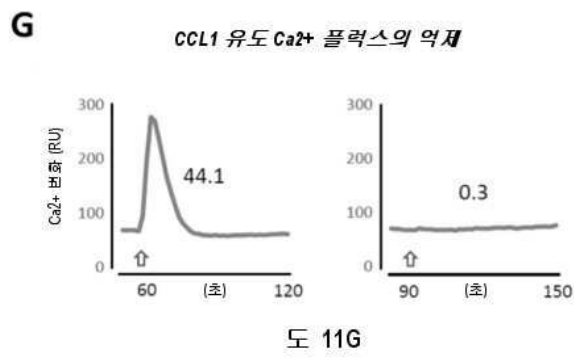
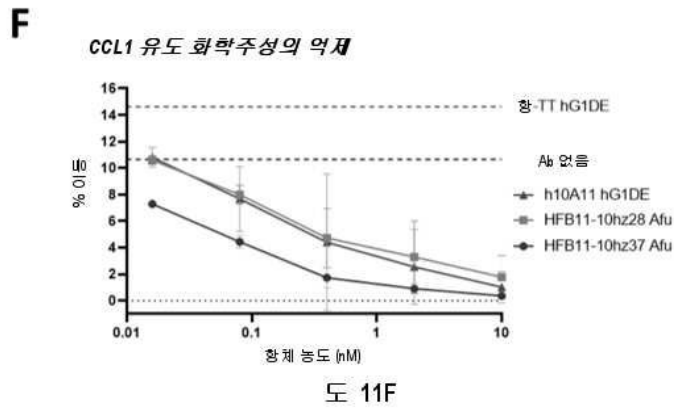
도 11D

**E**

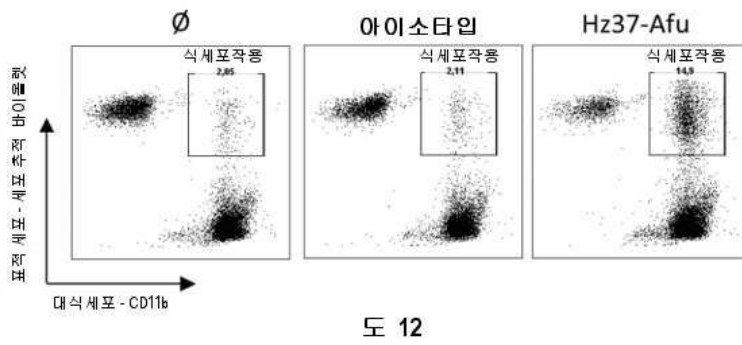


도 11E

도면11fg

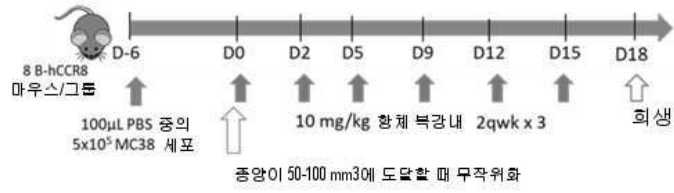


도면12

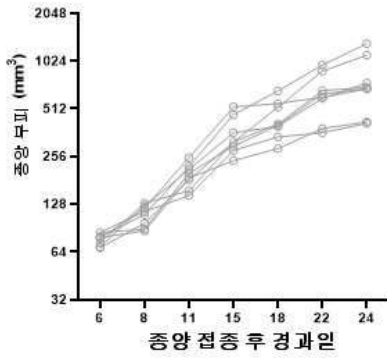


도면13ad

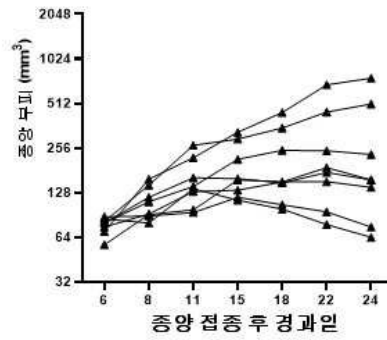
A



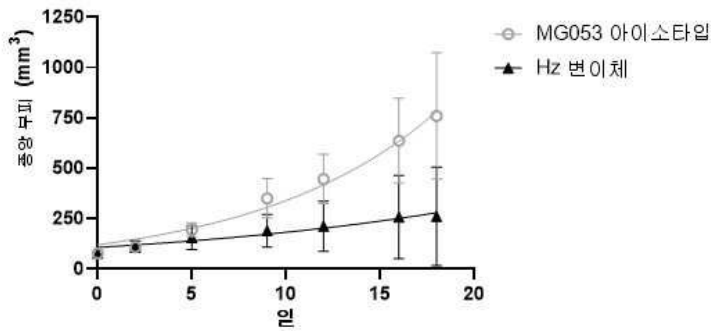
도 13A



도 13B

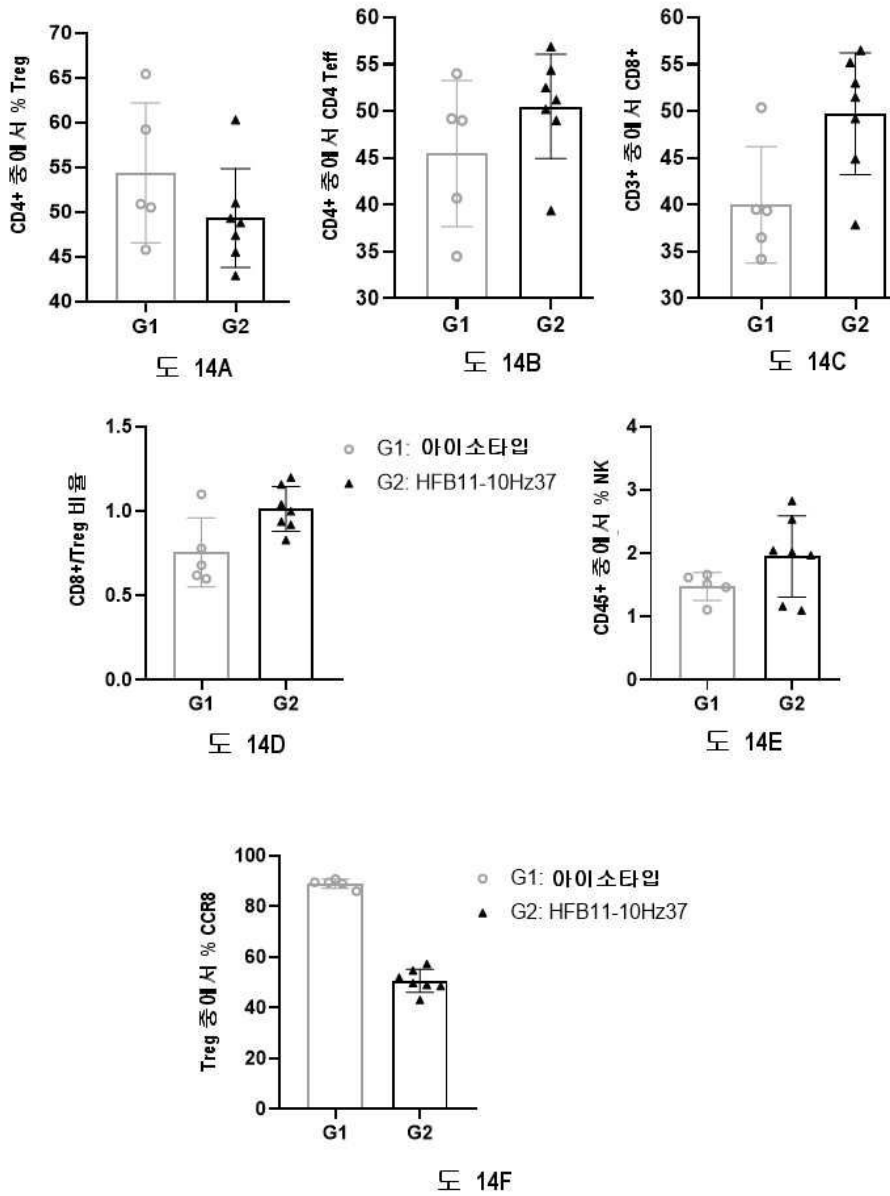


도 13C

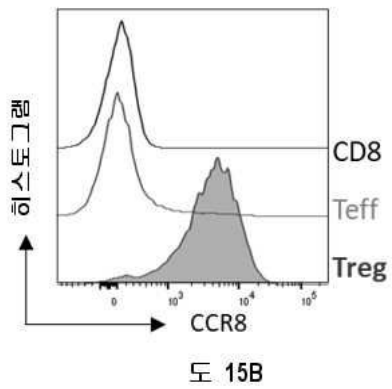
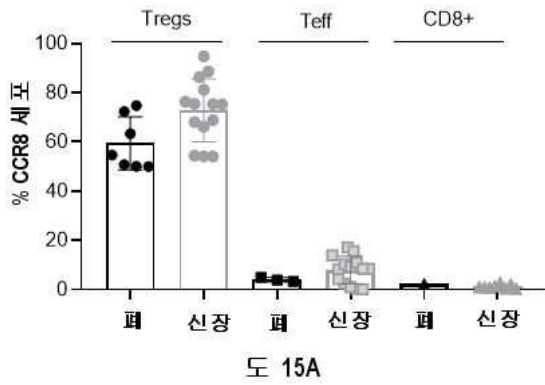


도 13D

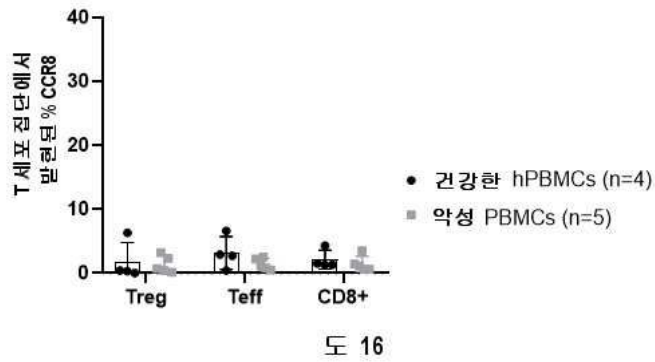
도면14af



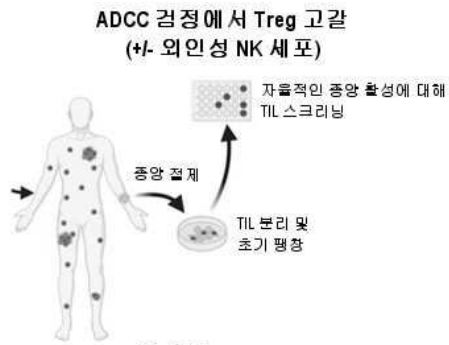
도면15ab



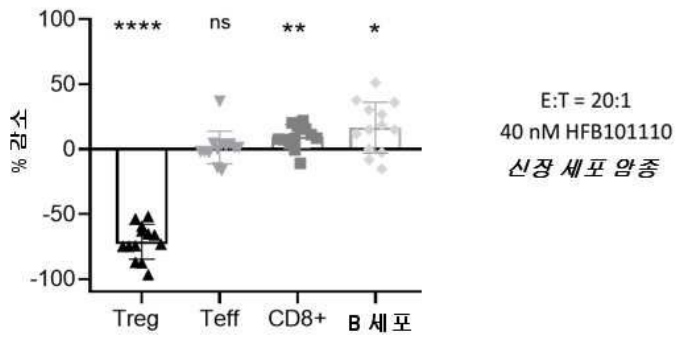
도면16



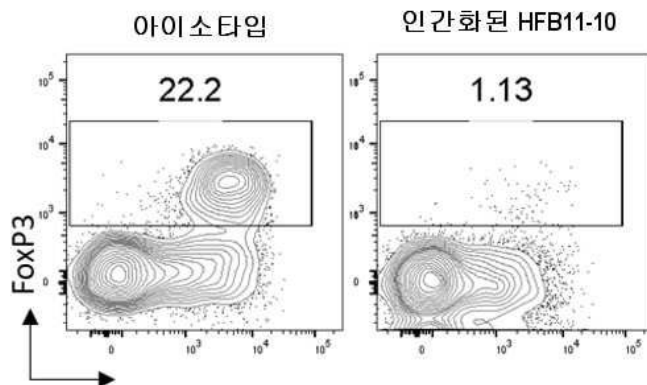
도면17ac



도 17A

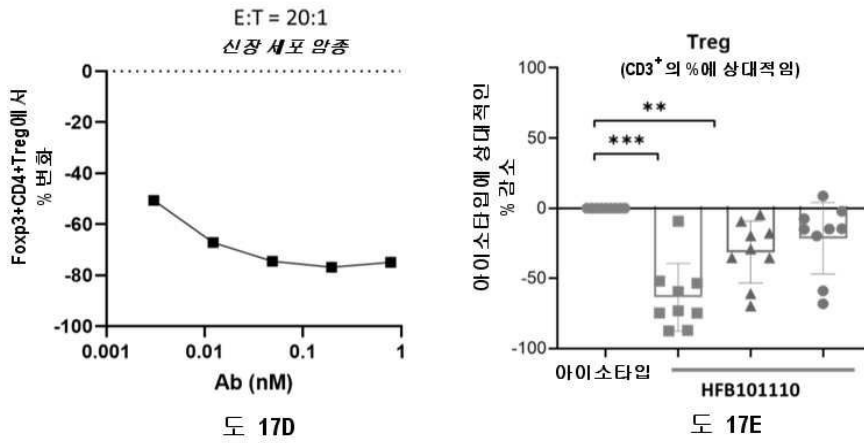


도 17B



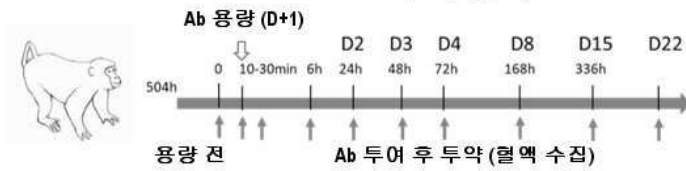
도 17C

도면17de



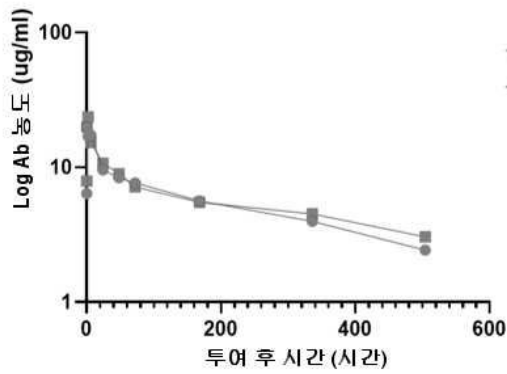
도면18ab

**A** 시노몰구스 원숭이(1마리 암컷/1마리 수컷)에 대한 단일 정맥내 주입 (1 mg/kg, 3w)



도 18A

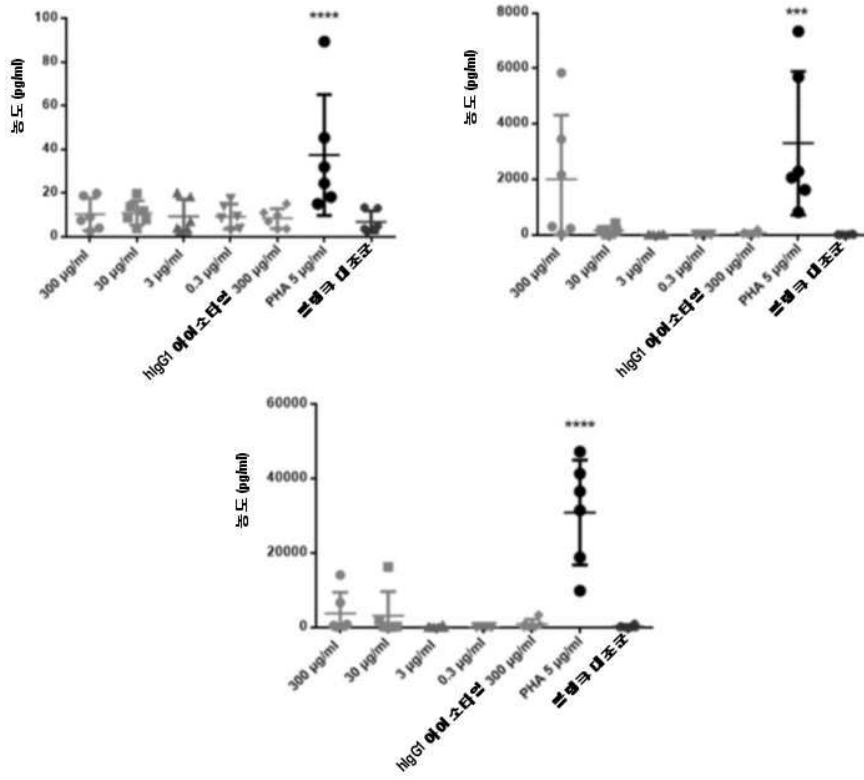
**B**



도 18B

도면18c

C



도 18C

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.