



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117425677 A

(43) 申请公布日 2024.01.19

(21) 申请号 202280040102.9

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

(22) 申请日 2022.07.27

72001

(30) 优先权数据

专利代理人 李唐 杨思捷

63/226118 2021.07.27 US

(51) Int.CI.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 16/28 (2006.01)

2023.12.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/074214 2022.07.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/010054 EN 2023.02.02

(71) 申请人 艾伯维公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 A · J · 麦克拉斯基

A · M · 施密特鲍斯蒂安

权利要求书1页 说明书19页

J · 西格尔 J · L · 威尔斯巴赫

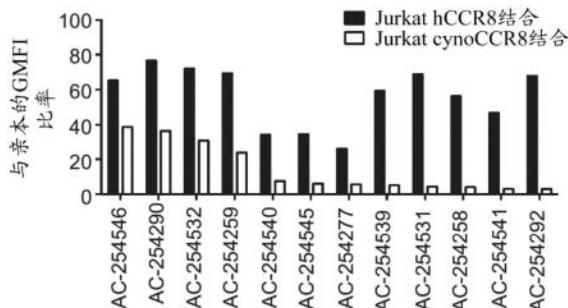
序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

抗cCR8抗体

(57) 摘要

本公开提供了抗CCR8抗体，包括使用此类抗体的组合物和方法。



1. 一种抗CCR8抗体,所述抗体包含(i)包含三个CDR的VH链;和(ii)包含三个CDR的VL链,其中:

VH CDR#1是GFIFSNAVMY (SEQ ID NO:1);
VH CDR#2是RIKTKFNNYATYYADAVKG (SEQ ID NO:2);
VH CDR#3是GDRNKPFA (SEQ ID NO:3);
VL CDR#1是RASTSVITLLH (SEQ ID NO:4);
VL CDR#2是GASNLES (SEQ ID NO:5);并且
VL CDR#3是QQSWNDPYT (SEQ ID NO:6)。

2. 根据权利要求1所述的抗CCR8抗体,其中所述抗体包含:包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的重链可变区和包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的轻链可变区。

3. 根据权利要求1所述的抗CCR8抗体,其中所述抗体包含:包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链和包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的轻链。

4. 根据权利要求3所述的抗CCR8抗体,其中所述抗体是无岩藻糖基化的。

5. 一种组合物,所述组合物包含多种根据权利要求1所述的抗CCR8抗体。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述组合物中大于80%的所述抗CCR8抗体是无岩藻糖基化的。

7. 根据权利要求1所述的抗CCR8抗体,所述抗体为IgG。

8. 根据权利要求7所述的抗CCR8抗体,其中所述抗体包含含有Fc部分的人重链恒定区,其中所述Fc部分是人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM同种型。

9. 根据权利要求8所述的抗CCR8抗体,所述抗体包含κ轻链恒定区。

10. 一种治疗实体瘤的方法,所述方法包括向有需要的患者施用根据权利要求4所述的抗体。

11. 一种包含编码抗CCR8抗体的核苷酸序列的多核苷酸,其中所述抗体包含(i)包含三个CDR的VH链;和(ii)包含三个CDR的VL链,其中:

VH CDR#1是GFIFSNAVMY (SEQ ID NO:1);
VH CDR#2是RIKTKFNNYATYYADAVKG (SEQ ID NO:2);
VH CDR#3是GDRNKPFA (SEQ ID NO:3);
VL CDR#1是RASTSVITLLH (SEQ ID NO:4);
VL CDR#2是GASNLES (SEQ ID NO:5);并且
VL CDR#3是QQSWNDPYT (SEQ ID NO:6)。

12. 一种表达载体,所述表达载体包含根据权利要求11所述的多核苷酸。

13. 一种真核宿主细胞,所述真核宿主细胞用根据权利要求12所述的载体转染。

14. 根据权利要求13所述的真核宿主细胞,所述真核宿主细胞是哺乳动物宿主细胞。

15. 一种产生抗CCR8抗体的方法,所述方法包括:(a)培养根据权利要求14所述的真核宿主细胞以及(b)回收所述抗CCR8抗体。

16. 一种治疗实体瘤的方法,所述方法包括向有需要的患者施用根据权利要求5所述的组合物。

抗cCR8抗体

[0001] 1.序列表的引用

[0002] 本申请包括以名称为SL-ANTI-CCR8ANTIBODIES的xml文件形式以电子方式提交的序列表,该序列表创建于2022年7月25日,大小为17千字节。该序列表以引用方式并入本文。

[0003] 2.相关专利申请的交叉引用

[0004] 本申请根据35 U.S.C. §119(e)要求于2021年7月27日提交的美国临时申请第63/226,118号的权益,该美国临时申请的公开内容以引用方式整体并入本文。

3. 技术领域

[0005] 本申请尤其涉及新型抗CCR8抗体及其制备和使用方法。

4. 背景技术

[0006] 在肿瘤内,调节性T细胞(Treg)是已知会防止抗肿瘤免疫应答的关键抑制性群体。已经将瘤内Treg的存在增加与几种癌症中较差的患者结局相关联(Shang等人,Nature Sci. Reports,2015;Fridman等人,Nat Rev Clin Oncol.2017;Bruni等人,Nat Rev Cancer.2020)。趋化因子受体8(CCR8)是在几种人类癌症中由瘤内Treg独特表达的细胞表面蛋白(Plitas等人,Immunity 2016;De Simone等人,Immunity 2016)。这使得CCR8成为经由抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导选择性瘤内Treg消耗以增强抗肿瘤免疫的有吸引力的靶标。

[0007] 虽然已经对Treg消耗进行了长期研究,但是由于在肿瘤环境外肿瘤浸润效应T细胞群和/或Treg上的靶标表达,这些治疗中的大多数治疗功效有限。本领域仍然需要触发瘤内免疫阻抑性Treg死亡而不消耗肿瘤微环境中的其它关键效应T细胞群或外周Treg的单克隆抗体治疗剂。

5. 发明内容

[0008] 已证实抗CCR8单克隆抗体经由抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导选择性瘤内Treg消耗。因为CCR8优先由肿瘤浸润性Treg表达并且不在外周血Treg中或不由有益效应T细胞群高度表达,所以抗CCR8抗体将消耗瘤内Treg并增强抗肿瘤免疫。而抗CCR8抗体单一疗法独立有效,特异性去除肿瘤内的Treg为旨在同时刺激抗肿瘤免疫应答的适当组合治疗方法提供了顺从的环境。例如,可能需要与检查点抑制剂如抗PD-1组合以在Treg消耗时完全驱动有效的抗肿瘤免疫。

[0009] 因此,提供了特异性结合CCR8并介导表达CCR8的Treg的ADCC的单克隆人源化抗体的氨基酸序列。抗体在结构上由包含特异性结合CCR8的互补决定区(CDR)的可变重链和可变轻链组成。所述抗体还包括包含片段可结晶区(Fc)的人重链恒定区、以及轻链恒定区。由抗体的氨基酸序列编码的这些结构元件构成作为单一疗法或与其它治疗剂组合,治疗患者的实体瘤有效的药物组合物。

6. 附图说明

- [0010] 图1示出了嵌合大鼠/hIgG1人CCR8特异性嵌合mAb与表达人或食蟹猴CCR8的Jurkat细胞的结合。
- [0011] 图2示出了表位分仓实验的结果。
- [0012] 图3示出了ABBV-514的重链序列和轻链序列。
- [0013] 图4A示出了无岩藻糖基化ABBV-514与表达内源CCR8的TALL-1细胞或TALL-1 CCR8敲除细胞和与Jurkat亲本细胞或过表达人或食蟹猴CCR8的细胞的结合剂量-应答曲线。图4B示出了岩藻糖基化(WT PR-1925514)对比无岩藻糖基化ABBV-514与TALL-1细胞的结合。
- [0014] 图5A-图5D示出了岩藻糖基化(WT PR-1925514)对比无岩藻糖基化ABBV-514的ADCC报告因子生物测定数据。
- [0015] 图6示出了用纯化的NK效应细胞和TALL-1靶细胞的ADCC测定的结果。
- [0016] 图7示出了CCR8 β -抑制蛋白报告因子测定的结果,示出了ABBV-514对CCL1与CCR8的结合的影响。

7. 具体实施方式

- [0017] Treg是具有瘤内免疫阻抑作用的CD4+ T细胞的子集。Treg阻抑CD4+ T细胞和CD8+ T细胞的活化、增殖和细胞因子产生,防止有害的自身免疫应答。然而,Treg也阻抑肿瘤免疫,并且已将高瘤内Treg水平与几种癌症的阴性结局相关联。
- [0018] CCR8是由七次跨膜蛋白组成的C-C基序趋化因子受体,该受体在T-辅助2型(Th2)淋巴细胞免疫应答和T细胞运输至皮肤的情况下介导趋化性和细胞/细胞相互作用。CCR8缺陷型小鼠是活的、可育的并且很大程度上是正常的,除了它们在某些Th2相关的临床前模型中不能产生稳健的Th2应答外(Chensue等人,J Exp Med 5,2001)。主要与CCR8结合的配体是CCL1,但是CCL18(人)和CCL8(鼠)也是该受体的配体。
- [0019] 浸润肿瘤的表达CCR8的Treg显示出高度活化和免疫阻抑表型。CCR8敲除小鼠中的肿瘤研究指示,CCR8表达的丧失不影响Treg向肿瘤微环境的募集、活化状态或阻抑能力(Van Damme等人,J Immunother Cancer.9(2),2021)。相反,CCR8表达是高度阻抑性Treg的标志物。因此,消耗表达CCR8的Treg提供了抗肿瘤益处。
- [0020] CCR8特异性替代抗体经由ADCC介导选择性瘤内Treg消耗。另外,抗CCR8替代抗体显著增强循环的肿瘤特异性CD8+效应T淋巴细胞的频率。这些作用与小鼠同基因肿瘤模型中的功效相关。(Campbell等人,Cancer Research 81,2021)。
- [0021] 本发明人已经开发了特异性结合细胞表面表达的CCR8(例如瘤内Treg)的治疗性单克隆抗体。在一个实施方案中,该抗体由两条可变链(一条重链和一条轻链)组成。在每条可变链上,存在允许抗体与CCR8结合的三个CDR。在两条可变链上,共有六个不同的CDR。另外,该抗体含有包含免疫球蛋白G1类(IgG1)的人Fc的人重链恒定区。本文所述的抗CCR8抗体可以是岩藻糖基化的或无岩藻糖基化的,并且展示出体外功能性、免疫安全性和药物样特性。
- [0022] 在一些实施方案中,该抗体包含无岩藻糖基化的IgG Fc恒定区。在一个实施方案中,无岩藻糖基化Fc恒定区是IgG1。无岩藻糖基化可以通过本领域已知的技术进行。参见,例如Mol Cancer Ther (2020) 19 (5) :1102-1109 和PNAS (2013) 110 (14) 5404-5409。例如,由

于例如GDP-甘露糖4,6-脱水酶的缺乏,在GDP-岩藻糖形成方面有缺陷的细胞系中产生抗体;在具有降低的岩藻糖基转移酶水平的细胞中产生抗体;在具有降低的GDP-岩藻糖转运蛋白水平的细胞中产生抗体;在过表达 β -1,4-甘露糖基-糖蛋白4- β -N-乙酰葡萄糖胺转移酶(GnT-III)的细胞中产生抗体;或在表达细菌GDP-6-脱氧-D-来苏-4-己酮糖还原酶(RMD)的细胞中产生抗体。在一个实施方案中,用于产生本发明的无岩藻糖基化抗CCR8抗体的细胞是经工程化以表达假单胞菌RMD的CHO细胞。抗体的无岩藻糖基化程度可通过本领域已知的技术确定。

[0023] 为了获得与人和食蟹猴CCR8交叉反应的抗CCR8抗体,评价了小鼠-人(大鼠/hIgG1)嵌合抗体与过表达人或食蟹猴CCR8的Jurkat细胞结合的能力。经由流式细胞术分析结果,如通过本领域已知的技术进行的。因此,最终的抗CCR8抗体与人和食蟹猴CCR8交叉反应并在两种物种中介导ADCC,但不结合小鼠、大鼠或兔CCR8。

[0024] 在某些实施方案中,与该抗体的岩藻糖基化形式相比,本发明的无岩藻糖基化抗体对激活IgG受体具有更高的亲和性,以及在纯化的天然杀伤细胞或外周血单核细胞(PBMC)ADCC测定中具有增强的活性。抗CCR8抗体的ADCC活性可以使用本领域已知的ADCC生物测定技术来证明。例如,在与表达人或食蟹猴CCR8的Jurkat细胞共培养的人Fc γ RIIIa V158或F158等位基因变体报告系中,抗CCR8抗体触发ADCC,如使用本领域已知的技术经由发光诱导所测量的。

[0025] 另外,本文所述的抗体干扰其它天然存在的配体(如CCL1)的功效,这些配体也结合CCR8,但仅在比结合或ADCC活性显著更高的EC50下。该测试通过本领域已知的技术进行,例如经由 β -抑制蛋白报告因子测定。

[0026] 如本文所用,术语“抗体”(Ab)是指特异性结合特定抗原例如CCR8的免疫球蛋白分子。本公开的抗CCR8抗体结合Treg上的人CCR8并由此调节免疫系统。本公开的抗CCR8抗体在轻链和重链可变结构域中都包含互补决定区(CDR),也称为高变区。可变结构域的更高度保守的部分称为骨架(FR)。如本领域已知的,描绘抗体高变区的氨基酸位置/边界可根据上下文和本领域已知的各种定义而变化。可变结构域内的一些位置可视为杂合高变位置,因为这些位置在一组标准下可视为在高变区内,而在不同组标准下可视为在高变区外。这些位置中的一个或多个也可以在延伸的高变区中发现。本公开提供了在这些杂合高变位置包含改变的抗体。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区,主要通过采用 β -折叠构型,通过三个CDR连接,其形成环连接,并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分。每条链中的CDR通过FR区而紧密靠近地结合在一起,并且利用来自另一条链的CDR帮助形成抗体的靶结合位点。参见Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health,Bethesda,Md.1987)。

[0027] 本公开的抗体可以是多克隆的、单克隆的、遗传工程化的和/或在性质上另外修饰过的,包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、单链抗体等。在各种实施方案中,抗体包含抗体恒定区的全部或一部分。在一些实施方案中,恒定区是选自IgA(例如,IgA1或IgA2)、IgD、IgE、IgG(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)和IgM的同种型。在具体实施方案中,本文所述的抗CCR8抗体包含IgG1。在其它实施方案中,抗CCR8抗体包含IgG2。在其它实施方案中,抗CCR8抗体包含IgG4。如本文所用,抗体的“恒定区”包括天然恒定区、同种异型或变体。

[0028] 抗CCR8抗体的轻链恒定区可以是卡帕(κ)轻链区或兰木达(λ)区。 λ 轻链区可以是

任何一种已知的亚型,例如 $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$ 或 $\lambda 4$ 。在一些实施方案中,抗CCR8抗体包含卡帕(κ)轻链区。

[0029] 如本文所用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。单克隆抗体通过本领域可获得的或已知的任何方法衍生自单个克隆,包括任何真核,原核或噬菌体克隆。可使用本领域已知的多种技术制备可用于本公开的单克隆抗体,包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或其组合。

[0030] 本文所用的术语“嵌合”抗体是指具有衍生自非人免疫球蛋白(例如大鼠或小鼠抗体)的可变序列以及人免疫球蛋白恒定区(通常选自人免疫球蛋白模板)的抗体。

[0031] 非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式包含基本上至少一个、通常两个可变结构域中的全部,其中全部或基本上全部的CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些CDR区,并且全部或基本上全部的FR区是人免疫球蛋白序列中的那些FR区。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白共有序列的一部分。

[0032] “人抗体”包括具有人免疫球蛋白氨基酸序列的抗体,并包括分离自人免疫球蛋白文库或分离自针对一种或多种人免疫球蛋白而转基因且不表达内源功能性免疫球蛋白的动物的抗体。人抗体可通过本领域已知的多种方法来制备,包括使用衍生自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法。

[0033] 本公开的抗CCR8抗体包括全长(完整)的抗体分子。

[0034] 抗CCR8抗体可以是其序列已被修饰成改变至少一种恒定区介导的生物效应器功能的抗体。例如,本文所述的抗CCR8抗体包括相对于未修饰的抗体已被修饰成获得了至少一种恒定区介导的生物效应器功能(例如,增强Fc γ R相互作用)的抗体(参见,例如,美国专利申请第2006/0134709号)或增强抗体介导ADCC的能力。例如,本公开的抗CCR8抗体可以具有以比相应的未修饰恒定区更大的亲和力来结合Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIB的恒定区。本公开的抗CCR8抗体可以是具有经修饰的Fc区并介导增强的ADCC应答的抗体,其中相对于具有相同可变区(即,VH和VL)和野生型IgG1 Fc区(即,野生型CL、CH1、CH2和CH3)的抗体,ADCC应答增强。能够增强ADCC的Fc修饰,诸如氨基酸序列突变,是本领域已知的,并且可以包括以下突变集合:S239D/I332E;F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L;S239D/I332E/A330L;和S298A/E333A/K334A。

[0035] 包含人IgG4恒定区的抗CCR8抗体可以包含S228P突变,据报道其防止了Fab臂交换。参见,例如,Silva,JP等人Journal of Biological Chemistry,290 (9),5462-5469 (2015)。

[0036] 在一些实施方案中,抗CCR8抗体包括增加或减少其与胎儿Fc受体FcRn的结合亲和力的改变,例如,通过在FcRn相互作用中所涉及的特定区域处对免疫球蛋白恒定区区段进行突变。在特定实施方案中,将IgG类抗CCR8抗体突变,使得重链恒定区的氨基酸残基250、314和428中的至少一个被单独取代或以其任何组合形式被取代。对于第250位,取代的氨基酸残基可以是除苏氨酸以外的任何氨基酸残基,包括但不限于丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。对于第314位,取代的氨基酸残基可以是除亮氨酸以外的任何氨基酸残基,包括但不限于丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰

胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。对于第428位，取代的氨基酸残基可以是除甲硫氨酸以外的任何氨基酸残基，包括但不限于丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。已知改变Fc效应器功能的示例性取代是Fc取代M428L，其可与Fc取代T250Q组合发生。第7,217,797号美国专利的表1中标识了合适的氨基酸取代的其它具体组合。这样的突变增加了与FcRn的结合，这保护抗体免于降解并增加其半衰期。

[0037] 对人CCR8具有高亲和力的抗CCR8抗体对于治疗和诊断用途而言可能是理想的。因此，本公开考虑了对人CCR8具有高结合亲和力的抗体。在具体的实施方案中，抗CCR8抗体以至少约100nM的亲和力结合人CCR8，但可表现出更高的亲和力，例如至少约90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.1nM、0.01nM或者甚至更高。在一些实施方案中，抗体以约1pM至约10nM、约100pM至约10nM、约100pM至约1nM的范围内的亲和力或者在任何前述值之间的范围内的亲和力结合人CCR8。

[0038] 在一些实施方案中，本发明提供了单克隆抗CCR8抗体，该抗体包含两组六个不同的互补决定区(CDR)、两组两个不同的可变区、两条全重链、两条全轻链和人重链恒定区。

[0039] 在一些实施方案中，该抗体是结合趋化因子受体8的重组、无岩藻糖基化、人源化IgG1κ单克隆抗体。

[0040] 在一个实施方案中，抗体包含含有以下序列的六个CDR：

[0041] CDR-H1:GFIFSNAVMY (SEQ ID NO:1)

[0042] CDR-H2:RIKTKFNNYATYYADAVKG (SEQ ID NO:2)

[0043] CDR-H3:GDRNKPFA (SEQ ID NO:3)

[0044] CDR-L1:RASTSVITLLH (SEQ ID NO:4)

[0045] CDR-L2:GASNLES (SEQ ID NO:5)

[0046] CDR-L3:QQSWNDPYT (SEQ ID NO:6)

[0047] 在一些实施方案中，本公开的抗体包含具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的CDR-H1、具有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的CDR-H2；具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的CDR-H3、具有如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的CDR-L1、具有如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CDR-L2；以及具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的CDR-L3。

[0048] 在一些实施方案中，本公开的抗体包含含有如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的重链可变区：

[0049] EVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFIFSNAVMYWVRQASGKGLEWVARIKTFNNYAT YYADAV KGRFTISRDDSKNMVYLQMNSLKTEDTAVYYCTA GDRNKPFAWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:7) :和含有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的轻链可变区：ETVVTQSPATLSLSPGERAT LSCRASTSVITLLHW FQQKPGQAPRLLIHGANLESRVPA RFSGSGSGTDFLTISLEPEDFATYFCQQSWNDPYTFGQ GTKLEIK (SEQ ID NO:8) 。

[0050] 在一些实施方案中，本公开的抗体包含含有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链(恒定区为粗体；重链可变结构域加下划线；CDR是带下划线的粗体斜体(以出现顺序分别公开为SEQ ID NO:1-3)：

- EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFIFSNAVMYWVRQASGKGL
EWVARIKTKFNNYATYYADAVKGRFTISRDDSKNMVYLQMNSLKTEDTA
VYYCTAGDRNKPFAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSSVV
TVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (全长序列公开为 SEQ ID NO: 9)
- [0051] [0052] 和含有如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的轻链(恒定区为粗体;轻链可变结构域加下划线;CDR是带下划线的粗体斜体(CDR序列以出现顺序分别公开为SEQ ID NO:4-6)：
ETVVTQSPATLSLSPGERATLSCRASTSVITLLHWFFQQKPGQAPRLL
[0053] IHGASNLESRVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYFCQOSWNNDPYTF
GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
[0054] QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (公开为 SEQ ID NO: 10 的全长序列)。
- [0055] 在一个实施方案中,本公开的抗体包含根据SEQ ID NO:10的轻链和C端赖氨酸截短的重链,例如,根据SEQ ID NO:9的C端赖氨酸截短的重链:
- EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFIFSNAVMYWVRQASGKGLEWV
ARIKTKFNNYATYYADAVKGRFTISRDDSKNMVYLQMNSLKTEDTAVY
YCTAGDRNKPFAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
[0056] GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (公开为 SEQ ID NO: 11 的末端
 赖氨酸截短的序列)。
- [0057] 在一个实施方案中,本公开的抗体的重链由以下核苷酸序列(公开为SEQ ID NO: 12的全长序列)编码:

*ATGGAATTCGGCCTGAGCTGGCTGTTCTGGTGGCCATCCTGAAGGG
 CGTGCAGTGCAGACTGGTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCA
 GCCTGGCGGATCTCTGAAGCTGTCTGTGCCGCCAGCGGCTTCATCTT
CAGCAACGCCGTGATGTACTGGTCCGACAGGCCTCTGGCAAAGGCC
TGGAATGGGTCGCCAGAATCAAGACCAAGTTCAACAACTACGCCACC
TACTACGCCGACGCCGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCAGGGACGA*

[0058] *CAGCAAGAACATGGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGG
 ACACCGCCGTGTA~~TACTGCACAGCCGGCGACAGAAACAAGCC~~CTT
GCCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTTACCGTTAGCTCTGCCCTCAC
CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAAGAGCAC
CTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGA~~ACTCAGGC~~CCCTGACC
AGCGGCGTGACACCTCCGGCTG~~CCTACAGC~~CTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGT~~GACCGT~~GCCCTCCAGCAGCTTGGC
ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC
AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAA~~ACTC~~AC
ACATGCCACC~~GT~~CCCAGCACCTGA~~ACTC~~CTGGGGGACCGTC
AGTCTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGT~~CACATG~~CGTGGT~~GACGT~~GAGCCACG
AAGACCC~~T~~GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGAGGAGCAGTACAACAG
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGCCTGCACCAGGACTG
GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT~~G~~CAAGGTCTCCAACAAAGCCCT
CCCAGCCCCATCGAGAAAACC~~ATCT~~CCAAAGCCAAGGGCAGCC
CCGAGAACCAAGGTGTACACC~~CTG~~CCCCCATCCC~~GGG~~GAGGAGA
TGACCAAGAACCAAGGT~~CAGC~~CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
ATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCGTGCTGGACTCCGACGG
CTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG
GCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT
GCACAAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC~~GT~~CTCCGGCAA*

ATGA

- [0060] 分泌信号肽为斜体；包括最终终止密码子 (TGA)；恒定区为粗体；CDR加下划线。
- [0061] 在一个实施方案中，本公开的抗体的轻链由以下核苷酸序列(公开为SEQ ID NO: 13的全长序列)编码：

[0062]

*ATGGACATGCGGGTGCCGCCAGCTGCTGGACTTCTGCTGCTGTG
 GTTCCCCGGCAGCAGATGCGAGACAGTGGTCACACAGTCTCCGCCACA
 CTGTCACTGTCTCCAGGCGAAAGAGGCCACACTGAGCTGTAGAGCCAGC
ACCAGCGTGATCACACTGCTGCACTGGTCCAGCAGAAGCCTGGACAG
GCTCCCAGACTGCTGATTCACGGGCCAGCAACCTGGAAAGCAGAGTG
 CCTGCCAGATTTCGGCAGCGGCTCTGGCACCGATTCACCCCTGACCA
 TAAGCAGCCTGGAACCTGAGGACTTCGCCACCTACTTTGCCAGCAGA
GCTGGAACGACCCCTACACCTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCA
AGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGA
TGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGCGCTGCTGAAT
AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAAC
GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC
AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCGTACGCTGAGC
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAACAGTCACC
CATCAGGGCCTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGA
GAGTGTAG*

- [0064] 分泌信号肽为斜体；包括最终终止密码子 (TAG)；恒定区为粗体；CDR加下划线。
- [0065] 在一些实施方案中，抗体包含人重链恒定区，该恒定区包含人CH1、人铰链、人CH2和人CH3结构域。在一些实施方案中，编码的重链恒定区包含Fc部分，其中该Fc部分是人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM同种型。在一个实施方案中，Fc是IgG1，并且同种异型是 α 非 α 。在一个实施方案中，轻链是 κ 轻链。
- [0066] 在一些实施方案中，该抗体包含无岩藻糖基化的IgG1 Fc恒定区。无岩藻糖基化可以通过本领域已知的技术进行。例如，由于例如GDP-甘露糖4,6-脱水酶的缺乏，在GDP-岩藻糖形成方面有缺陷的细胞系中产生抗体；在具有降低的岩藻糖基转移酶水平的细胞中产生抗体；在具有降低的GDP-岩藻糖转运蛋白水平的细胞中产生抗体；在过表达 β -1,4-甘露糖基-糖蛋白4- β -N-乙酰葡萄糖胺转移酶(GnT-III)的细胞中产生抗体；或在表达细菌GDP-6-脱氧-D-来苏-4-己酮糖还原酶(RMD)的细胞中产生抗体。用于产生本发明的无岩藻糖基化抗CCR8抗体的细胞是经工程化以表达假单胞菌RMD的CHO细胞。抗体的无岩藻糖基化程度可通过本领域已知的技术确定。通常，该抗体是70%或更多、80%或更多、90%或更多、或约99%、或约100%无岩藻糖基化的。优选地，无岩藻糖基化的程度等于或大于80%。在一些实施方案中，该抗体在位置ASN-300(EU: ASN-297)处是70%或更多、80%或更多、90%或更多、或约100%无岩藻糖基化的。无岩藻糖基化可经由亲水性相互作用色谱(HILIC)测定技术确定，其中通过片段化抗体的极性依赖性分离确定无岩藻糖基化的程度。
- [0067] 在一个实施方案中，通过具有荧光检测的HILIC分析释放的N-连接的聚糖来确定总无岩藻糖基化聚糖物质。使用肽N-糖苷酶F(PNG酶)释放聚糖，随后用荧光标签标记。通过具有荧光检测的HILIC分析荧光标记的N-连接聚糖。基于所有无岩藻糖基化聚糖峰的峰面积之和相对于色谱图中所有聚糖峰的总峰面积来确定无岩藻糖基化聚糖物质的百分比。

相对丰度为0.5%或更高的所有峰都包括在无岩藻糖基化聚糖物质百分比的测定中。

[0068] 7.1. 编码抗CCR8抗体的多核苷酸、表达系统和制备抗体的方法

[0069] 本公开包含有编码抗CCR8抗体的免疫球蛋白轻链和重链基因的多核苷酸分子，包含这种多核苷酸的载体和能够产生本公开的抗CCR8抗体的宿主细胞。

[0070] 本公开的抗CCR8抗体可以通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链和重链基因来制备。为了重组表达抗体，用一种或多种携带编码抗体的免疫球蛋白轻链和重链的DNA片段的重组表达载体转染宿主细胞，使得轻链和重链在宿主细胞中表达，并任选地分泌到培养宿主细胞的培养基中，从该培养基中可以回收抗体。

[0071] 为了生成编码此类抗CCR8抗体的多核苷酸，首先获得编码轻链和重链可变区的DNA片段。这些DNA可以通过扩增和修饰编码轻链和重链可变序列的种系DNA或eDNA而获得，例如使用聚合酶链式反应(PCR)。

[0072] 一旦获得编码抗CCR8抗体相关的VH和VL区段的DNA片段，可通过常规的重组DNA技术进一步操纵这些DNA片段，例如将可变区基因转变为全长的抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操纵中，编码VL或VH的DNA片段可操作地连接到对编码另一蛋白质(诸如抗体恒定区或柔性接头)的另一个DNA片段。本文中所使用的术语“可操作地连接”是指将两个DNA片段连接使得由这两个DNA片段编码的氨基酸序列保持读码框一致。

[0073] 通过将编码VH的DNA可操作地连接到编码重链恒定区(CH1、CH2、CH3和任选CH4)的另一DNA分子上，可以将所分离的编码VH区的DNA转变为全长的重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见，例如，Kabat, E.A. 等人，1991，《具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Proteins of immunological interest)》，第五版，美国卫生和公众服务部(U.S. Department of Health and human services), NIH出版物编号91-3242)，包含有这些区域的DNA片段可通过常规的PCR扩增而获得。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区，但在某些实施方案中是IgG1或IgG4。对于Fab片段重链基因，可以将编码VH的DNA可操作地连接到另一个仅编码重链CH1恒定区的DNA分子。

[0074] 通过将编码VL的DNA可操作地连接到编码轻链恒定区CL的另一个DNA分子上，可以将编码VL区的分离的DNA转变为全长的轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列在本领域中是已知的(参见，例如，Kabat等人，1991，《具有免疫学意义的蛋白质序列》，第五版，美国卫生和公众服务部，NIH出版物编号91-3242)和包含这些区域的DNA片段可以通过常规的PCR扩增而获得。轻链恒定区可以是κ或λ恒定区，但在某些实施例中是κ恒定区。

[0075] 为了表达本公开的抗CCR8抗体，将如上所述获得的编码部分或全长的轻链和重链的DNA插入表达载体中，使得基因与转录和翻译控制序列可操作地连接。在本文中，术语“可操作地连接”意指将抗体基因连接到载体中，使得载体内的转录和翻译控制序列发挥其调节抗体基因转录和翻译的预期功能。对表达载体和表达控制序列进行选择以与所用表达宿主细胞相容。可以将抗体轻链基因和抗体重链基因插入到单独的载体中，或者更常见地，将两种基因插入到同一表达载体中。

[0076] 通过常规方法(例如，连接抗体基因片段和载体上的互补限制性位点，或者如果不存在限制性位点则进行平端连接)将抗体基因插入到表达载体中。在插入抗CCR8抗体相关的轻链或重链序列之前，表达载体可以已经携带有抗体恒定区序列。例如，一种将抗CCR8单克隆抗体相关的VH和VL序列转变为全长的抗体基因的方法是将它们分别插入到已经编码

重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,使得VH区段可操作地连接到载体内的CH区段上,而VL区段可操作地连接到载体内的CL区段。另外地或可选地,重组表达载体可以编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可以将抗体链基因克隆到载体中,使得信号肽以读码框一致的方式连接到抗体链基因的氨基端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽)。

[0077] 除了抗体链基因,本公开的重组表达载体携带控制抗体链基因在宿主细胞中表达的调节序列。术语“调节序列”旨在包括控制抗体链基因转录或翻译的启动子、增强子和其它表达控制元件(例如,聚腺苷酸化信号)。

[0078] 除了抗体链基因和调节序列之外,本公开的重组表达载体可以携带另外的序列,诸如调节载体在宿主细胞中复制的序列(例如,复制起点)和选择标记基因。选择标记基因有助于选择已导入了载体的宿主细胞。为了表达轻链和重链,通过常规的技术将编码重链和轻链的表达载体转染到宿主细胞中。术语“转染”的各种形式旨在包含有通常用于将外源DNA导入原核或真核宿主细胞的各种技术,例如电穿孔、脂质转染、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。

[0079] 可以在原核或真核宿主细胞中表达本公开的抗体。在某些实施方案中,在最佳地分泌正确折叠且有免疫活性的抗体的真核细胞例如哺乳动物宿主细胞中进行抗体的表达。用于表达本公开的重组抗体的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括在Urlaub和Chasin,1980,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4220的DHFR-CHO细胞,与DHFR选择性标志物一起使用,例如Kaufman和Sharp,1982,Mol.Biol.159:601-621)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体导入到哺乳动物宿主细胞时,通过将宿主细胞培养一段时间来产生抗体,该一段时间足以允许在宿主细胞中表达抗体或将抗体分泌到宿主细胞所生长的培养基中。可以使用常规的蛋白质纯化方法从培养基中回收抗体。宿主细胞也可用于产生完整抗体的部分,诸如Fab片段或scFv分子。应当理解,上述程序的变化在本公开的范围内。例如,可以期望用编码本公开的抗CCR8抗体的轻链或重链(但不是两者)的DNA转染宿主细胞。

[0080] 重组DNA技术也可用于去除不是结合人CCR8所必需的一些或全部编码轻链和重链之一或两者的DNA。由这种截短的DNA分子表达的分子也被包含在本公开的抗体中。

[0081] 为了重组表达本公开的抗CCR8抗体,可以将宿主细胞共转染两种本公开的表达载体,第一种载体编码重链来源的多肽,而第二种载体编码轻链来源的多肽。两种载体可以含有相同的选择标记,或者它们可以各自含有单独的选择标记。可选地,可以使用编码重链和轻链多肽两者的单一载体。

[0082] 一旦获得了编码抗CCR8抗体的一个或多个部分的多核苷酸,可以将进一步的改变或突变引入编码序列中,例如以生成编码具有不同CDR序列的抗体、对Fc受体具有降低的亲和力的抗体或不同亚类的抗体的多核苷酸。

[0083] 本公开的抗CCR8抗体还可以通过化学合成或通过使用无细胞平台来产生。

[0084] 7.2.抗CCR8抗体的纯化

[0085] 一旦通过重组表达产生了本公开的多肽,就可以通过本领域已知的用于纯化蛋白质的任何方法对其进行纯化。一旦被分离出来,抗CCR8抗体可以被进一步纯化。

[0086] 7.3.组合物

[0087] 本公开的抗体可以作为适于施用于受试者的组合物提供。在一些实施方案中，抗体组合物是包含本公开的抗体和药学上可接受的载剂的药物组合物。

[0088] 在一个实施方案中，提供了包含多种抗CCR8抗体和药学上可接受的载剂的药物组合物。在一个实施方案中，药物组合物的多种抗CCR8抗体是无岩藻糖基化的。通常，该多种抗体是70%或更多、80%或更多、90%或更多、或约99%、或约100%无岩藻糖基化的。优选地，无岩藻糖基化的程度等于或大于90%。在一些实施方案中，该多种抗体在位置ASN-300 (EU: ASN-297) 处是70%或更多、80%或更多、90%或更多、或约100%无岩藻糖基化的。抗体的无岩藻糖基化程度可通过本领域已知的技术确定。无岩藻糖基化可以经由亲水性相互作用色谱(HILIC) 测定技术来确定，其中通过片段化抗体的极性依赖性分离确定无岩藻糖基化的程度。在一个实施方案中，通过具有荧光检测的HILIC分析释放的N-连接的聚糖来确定总无岩藻糖基化聚糖物质。使用肽N-糖苷酶F (PNG酶F) 释放聚糖，随后用荧光标签标记。通过具有荧光检测的HILIC分析荧光标记的N-连接聚糖。基于所有无岩藻糖基化聚糖峰的峰面积之和相对于色谱图中所有聚糖峰的总峰面积来确定无岩藻糖基化聚糖物质的百分比。相对丰度为0.5%或更高的所有峰都包括在无岩藻糖基化聚糖物质百分比的测定中。

[0089] 7.4. 主题抗体的特性概述

[0090] 例如但不限于ABBV-514的主题抗体的特性包括以下：

[0091] 与CCR8的高亲和力结合，例如FACS结合平均EC₅₀为2μg/mL或更低、1μg/mL或更低、0.3μg/mL至0.7μg/mL、0.4μg/mL至0.6μg/mL、约0.5μg/mL或0.55μg/mL，用TALL-1细胞(成人T-ALL; RRID: CVCL_1736) 上内源表达的CCR8确定的；或与Jurkat细胞上过表达的人CCR8的FACS结合平均EC₅₀为2μg/mL或更低、1μg/mL或更低、0.3μg/mL至0.8μg/mL、0.4μg/mL至0.7μg/mL、约0.5μg/mL或0.6μg/mL；与人血中CD45RA低Treg上表达的CCR8的FACS结合平均EC₅₀为2μg/mL或更低、1μg/mL或更低、0.2μg/mL至0.6μg/mL、0.3μg/mL至0.5μg/mL、约0.5μg/mL或0.48μg/mL。

[0092] 与人CCR8的高特异性结合，例如与TALL-1 CCR8敲除细胞或亲本Jurkat细胞无特异性FACS结合。

[0093] 与食蟹猴CCR8的交叉反应性，例如，与Jurkat细胞上过表达的食蟹猴CCR8的FACS结合平均EC₅₀为5μg/mL或更低、3μg/mL或更低、2μg/mL或更低、大约1.5μg/mL或1.82μg/mL；或与食蟹猴血液中CD45RA低Treg上表达的CCR8的FACS结合平均EC₅₀为5μg/mL或更低、3μg/mL或更低、2μg/mL或更低、大约1.5μg/mL或1.62μg/mL。

[0094] 阻断CCL1/CCR8相互作用的能力差，例如CCL1/CCR8阻断活性的EC₅₀是结合人CCR8的EC₅₀的至少30倍、至少40倍、30倍至70倍之间、至少50倍或至少约50倍。

[0095] 相对于具有相同可变区的抗体和野生型岩藻糖基化IgG1诱导ADCC的能力增强。

[0096] 相对于具有相同可变区的抗体和野生型岩藻糖基化IgG1，与Fc γ受体的结合增强。

[0097] 通过细胞因子释放测定来确定免疫安全性良好。

[0098] 7.5. 使用方法

[0099] 在实施方案中，本文所述的方法牵涉用本发明的抗CCR8抗体治疗患有实体瘤的患者。在实施方案中，将包含抗CCR8抗体的组合物施用于有需要的受试者。

[0100] 在PD-1难治性Pan02小鼠模型中，靶向CCR8和PD-1的抗体的组合显示出比用任一

抗体的单一疗法改善的体内功效。消耗免疫阻抑性CCR8+Treg可与PD-1/PD配体1(PD-L1)阻滞协同作用以促进更强的CD8+效应T细胞应答并增强抗肿瘤免疫。在一个实施方案中,包含抗CCR8抗体的组合物作为包括施用靶向PD-1或PD-L1的抗体的组合疗法的一部分施用。在一个实施方案中,包含抗CCR8抗体的组合物作为与帕博利珠单抗(pembrolizumab)、布格利单抗(budigalimab)、纳武单抗(nivolumab)、西米普利单抗(cemiplimab)或多塔利单抗(dostarlimab)的组合疗法施用。在一个实施方案中,包含抗CCR8抗体的组合物作为与阿特珠单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、德瓦鲁单抗(durvalumab)的组合疗法施用。

[0101] 8.实施例

[0102] 以下实施例强调了本文所述抗体和结合片段的示例性实施方案的某些特征和特性,提供这些实施例是为了说明的目的。

[0103] 8.1.实施例1:大鼠杂交瘤的产生

[0104] 用2种不同的全长人CCR8 cDNA载体免疫大鼠(每种载体6只大鼠)。分离淋巴结细胞并与NS0融合以生成杂交瘤。扩增后,筛选杂交瘤上清液与在HEK293细胞上过表达的人或食蟹猴(“cyno”或“cy”)CCR8的结合。经由高通量抗体产生表达46个大鼠/hIgG1嵌合mAb,并且确认21个与人CCR8结合(图1)。基于在Jurkat CCR8过表达系中最高的食蟹猴交叉反应性,选择四种嵌合mAb AC-254290、AC-254532、AC-254546和AC-254259用于完全人源化。

[0105] 8.2.实施例2:通过与huCCR8的竞争结合的表位作图

[0106] 与来自BD Biosciences(克隆433H)和Biolegend(克隆L263G8)的人CCR8抗体一起,通过细胞表位作图测定测试所选嵌合抗体与Jurkat细胞上的人CCR8的结合。据报道两种商用抗体是通过用人CCR8-转染子免疫小鼠而生成的,并且与cyno CCR8都没有交叉反应性。将抗体与用饱和浓度的抗体1染色的细胞成对测试,洗涤,然后用抗体2染色,或反之亦然。

[0107] mAbs AC-254290和AC-254532以任一顺序干扰结合,表明它们与相同表位(表位A)结合(图2)。AC-254546显示出对AC-254290和AC-254532的中等表位结合干扰,但没有与相同表位结合的证据;因此AC-254546与表位B结合,该表位是独特的但接近表位A。AC-254259对任何其它抗体没有结合干扰,并且可能是独特表位(表位C)。BD Biosciences克隆433H具有与AC-254290相同的表位结合并且对AC-254532、AC-254546和Biolegend克隆L263G8具有一些干扰结合,因此与表位A分箱。基于BD Biosciences克隆433H和其它抗体的干扰数据,Biolegend克隆L263G8作为表位D分箱,表位D是独特的但接近表位A但不接近表位B。

[0108] 8.3.实施方案3:大鼠可变结构域/人IgG1 Fc嵌合体的人源化四种嵌合抗体AC-254290、AC-254532、AC-254546和AC-254259通过以下方式人源化: (i) 鉴定啮齿动物抗体序列;(ii) 鉴定CDR和抗体框架;(iii) 创建VH-VL结构模型;(iv) 鉴定用于回复突变的框架残基,以维持啮齿动物抗体的功能;(v) 选择具有高度同一性、最相似的CDR规范结构和需要最少回复突变的人种系;以及(iv) 通过CDR移植和掺入所选回复突变生成VH/VL序列。

[0109] 对于所选每种抗体产生四种人源化抗体。AC-254290需要基于序列和基于结构的方法进行人源化。直接CDR移植产生与表达人CCR8的Jurkat细胞弱结合的抗体。测试了基于预测的啮齿动物VH/VL结构/界面的回复突变。在HCDR3之前的残基三联体是CTA,其是非典型的。位置94(CTA中的A)几乎总是精氨酸(R)。具有CTR的两种人源化型式表现出与表达人

CCR8的Jurkat细胞的弱结合,EC₅₀为3.96μg/mL和5.61μg/mL。相反,在HCDR3之前具有CTA的两种人源化型式(CTAGDRNKFAY(SEQ ID NO:14)),其中一种是AC-264700,展示出强结合,EC₅₀为0.2559μg/mL和0.2302μg/mL,与AC-254290亲本抗体(EC₅₀为0.4538μg/mL)有利。

[0110] 评估人源化抗体结合人或食蟹猴CCR8的能力。通过用5x稀释液,测试从30μg/mL开始的8个浓度的抗体与过表达人或食蟹猴CCR8的Jurkat细胞的结合,确定EC₅₀。与测试CCR8抗体孵育后,洗涤细胞并与荧光染料标记的二抗孵育,洗涤并经由流式细胞术分析。

[0111] AC-254259和AC-254532分别表现出与cynoCCR8降低的结合和与HEK293细胞的高的非特异性结合。AC-264711(人源化AC-254546)和AC-264700(人源化AC-254290)由于其优异的靶结合、不存在非特异性结合以及对倾向性工程改造的有限需求而推进。

[0112] 8.4.实施例4:AC-264700的倾向性工程改造

[0113] AC-264700在HCDR2和LCDR1中分别在氨基酸61-62和氨基酸27-28(kabat)处具有DS基序(这是异构化的风险)并且在LCDR3中在氨基酸位置94-95(kabat)处具有DP基序(这使其经历潜在的片段化)。基于先前抗体的经验,HCDR2 DS可靠性突变为DA。DP基序的去除破坏了结合,但保留DP基序的抗体的片段化在应激测试中没有表现出来。产生了二十二种LCDR1 DS变异抗体,并且使用流式细胞术评估它们针对过表达的huCCR8或cyCCR8 Jurkat细胞的结合特性。通过流式细胞术评估与Jurkat亲本细胞的非特异性结合。基于有利的功能和药物样特性,选择十种变异抗体进行进一步表征。基于它们在hFc γ RIIIa V变体ADCC报告因子生物测定(Promega)中的特性(包括结合、减少的自我相互作用、缺乏非特异性、cyno交叉反应性和活性)的总体组合,选择两种变异抗体用于推进。

[0114] 使用流式细胞术通过已知方法评估候选分子针对Jurkat细胞表面上过表达的huCCR8或cyCCR8的结合能力。测试示例性抗体自我相互作用、结合huCCR8和cyCCR8的能力,使用报告因子生物测定测试ADCC能力,并测试与HEK293细胞的非特异性结合。当与亲本和其它候选抗体相比时,AC-277357对huCCR8和cyCCR8 Jurkat细胞均具有优异的结合能力(表1)。每种候选物的AC-SINS自我相互作用分数<1。在100μg/mL下,非特异性结合最大值范围为97至144GMFI。在10μg/mL下,非特异性结合最大值范围为94-111 GMFI。在1μg/mL下,非特异性结合最大值范围为87-102 GMFI。AC-277357在100μg/mL下对HEK293细胞具有最低的非特异性结合最大值,对huCCR8和cyCCR8 Jurkat细胞具有最强的结合,并且在ADCC报告因子生物测定中对huCCR8和cyCCR8 Jurkat靶细胞具有最大的信号诱导倍数。另外,当与亲本抗体比较时,AC-277357具有最低的自我相互作用分数之一。

[0115] 表1:AC-264700变体的比较

抗体	AC#	AC-264700	AC-277357	AC-277371	AC-277483
	突变	DS	D27→T	D27→G	S28→A
与 hu/cy CCR8 Jurkat 的结合	huCCR8 EC ₅₀ (nM)	2.33	1.51	1.87	2.90
	cyCCR8 EC ₅₀ (nM)	5.27	2.37	4.83	5.93
表达 ADCC 报告 因子 hu/cyCCR8 的 Jurkat 靶细胞	huCCR8 EC ₅₀ (nM)	0.12	0.10	0.05	0.07
	最大诱导倍数	12.8	15.7	12.7	13.6
	cyCCR8 EC ₅₀ (nM)	0.79	0.75	0.57	1.19
	最大诱导倍数	12.0	12.3	11.7	10.0

[0117] 8.5. 实例施5:AC-264711的倾向性工程改造

[0118] AC-264711在HCDR2区的氨基酸60-61(kabat)处具有NS基序,这呈现出脱氨基的风险。另外,HCDR3中的残基M100c在应力测试期间显示出高氧化水平。

[0119] 测试具有NS突变以去除倾向性的候选AC-264711变体自我相互作用、非特异性结合HEK293细胞、结合huCCR8和cyCCR8 Jurkat细胞以及在ADCC报告因子生物测定中用表达huCCR8的Jurkat细胞作为靶标诱导信号的能力。去除NS基序是耐受的。产生了二十九种NS变体,并使用流式细胞术评估了它们针对Jurkat亲本细胞和过表达huCCR8或cyCCR8 Jurkat细胞的结合特性。在ADCC报告因子生物测定中测试了具有最佳结合和药物样特性曲线的五种抗体,并且将具有最佳特性组合的三种抗体AC-275889、AC-275896和AC-275898推进进行M100c突变以防止氧化。

[0120] 产生具有M100c突变的AC-275889、AC-275896和AC-275898的变体,并在与NS突变体相同的测定中进行测试。使用来自这些测定的数据来区分药物样性质测试的八种抗体的优先次序。AC-291774和AC-291790具有最高的自我相互作用AC-SINS分数,分别为8.38和6.75。剩余的候选物具有范围为1.73至2.79的同等AC-SINS分数。AC-275896和AC-275898分别与HEK293细胞具有1780和1065GFMI的最大非特异性结合。AC-291790、AC-275889和AC-275898的非特异性结合最大值分别为335、148和141。在10 μ g/mL和1 μ g/mL下,所有候选分子具有同等的非特异性结合最大值,范围分别为61至67和57至60。AC-291774和AC-291790具有最低的非特异性结合,如通过与Jurkat亲本细胞的结合和疏水相互作用色谱法所指示,同时与AC-275889、AC-275896和AC-275898相比,维持与表达huCCR8和cyCCR8的Jurkat细胞的有效结合和用表达huCCR8和cyCCR8的Jurkat细胞的同等EC₅₀和ADCC报告信号的倍数诱导(表2)。

[0121] 表2.AC-264711变体的体外测定

抗体	AC 编号	AC-275889	AC-275896	AC-275898	AC-291774	AC-291790
	突变	N60→A	S61→E	S61→Q	N60→A M106→I	S61→Q M106→I
[0122] 与 hu/cy CCR8 结合	huCCR8 EC ₅₀ (nM)	12.19	49.41	8.39	9.57	17.67
	cyCCR8 EC ₅₀ (nM)	7.08	13.70	24.41	9.00	15.28
[0123] 表达 ADCC	huCCR8 EC ₅₀ (nM)	0.07	0.15	0.12	0.19	0.23
	最大诱导倍数	15.6	14.1	17.0	16.8	18.6
[0123] huCCR8 的 Jurkat	cyCCR8 EC ₅₀ (nM)	0.10	0.41	0.10	0.30	0.30
	最大诱导倍数	8.7	7.7	10.7	10.8	12.7

[0124] 8.6. 实施例6:最终候选抗体的选择

[0125] 选择AC-277357、AC-277371、AC-291774和AC-291790以在另外的药物样特性和体外免疫安全性实验中进一步评价。为了产生用于表征的无岩藻糖基化变体,以用于表达假单胞菌酶GDP-6-脱氧-D-来苏-4-己酮糖还原酶(RMD)的质粒转染表达AC-277357的细胞,该

酶将岩藻糖从头合成中的中间体转化为终末产物,导致无岩藻糖基化AC-277357的产生。

[0126] 评估候选分子的Jurkat huCCR8、Jurkat cyCCR8和TALL-1结合活性、以TALL-1作为靶标的hPBMC ADCC活性、在以过表达huCCR8的Jurkat细胞作为靶标的F158效应细胞中的ADCC活性以及在以过表达huCCR8的Jurkat细胞作为靶标的V158效应细胞中的活性。AC-277357(也称为PR-1925514)显示出与TALL-1细胞上表达的内源水平的CCR8的结合提高,并且无岩藻糖基化型式在原代细胞ADCC测定中更有活性(数据未示出)。AC-277357/PR-1925514更有效地结合人Treg上的CCR8,并且在细胞因子释放测定中具有比AC-291774(也称为PR-1928444)更好的特征(数据未示出)。选择具有无岩藻糖基化人IgG1 Fc的AC-277357/PR-1925514作为主要抗体,因为它具有最佳的体外功能和体外免疫安全性(IVIS)特征以及优良的药物样特性。

[0127] 8.7. 实施例7:结合和功能效力测定

[0128] 经由单点流式细胞术筛选抗体以评估与过表达人或食蟹猴CCR8的Jurkat细胞系的结合。通过用5x稀释液,经由流式细胞术测试从 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 开始的八个浓度的抗体与Jurkat人CCR8、Jurkat cyno CCR8和亲本Jurkat细胞的结合来确定 EC_{50} 。与测试CCR8抗体孵育后,洗涤细胞并与荧光染料标记的二抗孵育,洗涤并经由流式细胞术分析。

[0129] 人Fc γ RIIIa V变体核心试剂盒或人Fc γ RIIIa F变体细胞增殖模型购自Promega并按指导使用。过表达人或食蟹猴CCR8的Jurkat靶细胞系或亲本Jurkat对照细胞在ADCC测定缓冲液中洗涤一次,在ADCC测定缓冲液中稀释至 6×10^6 个细胞/ mL ,并以25个 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 平板接种于白色壁的96孔测定板(Costar)中。将抗体以3×最终浓度稀释于ADCC测定缓冲液中,每孔添加25 μL (测试范围从 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.000064\mu\text{g}/\text{mL}$ 的1:5倍7点稀释液)。将效应细胞(稳定表达人Fc γ RIIIa V158变体、人Fc γ RIIIa F158变体或小鼠Fc γ RIV和驱动萤火虫荧光素酶表达的NFAT应答元件)解冻并以1:2.5的最终效应物与靶标比率添加。在 37°C 、5% CO₂下孵育6小时后,将BioGlo剂(Promega)混合并按指导添加,测量发光信号。

[0130] 8.8. 实施例8:ABBV-514的剂量应答曲线

[0131] 评价AC-277357/PR-1925514的岩藻糖基化和无岩藻糖基化(重命名为ABBV-514)型式与过表达人或食蟹猴CCR8的Jurkat细胞系和表达内源水平的CCR8的TALL-1细胞的细胞结合。使用以上讨论的类似方法通过流式细胞术评估细胞结合。另外,评价亲本Jurkat(无CCR8表达)和CCR8敲除(KO)TALL-1对照系的结合。ABBV-514显示与Jurkat细胞中过表达的人和cyno CCR8结合,但不与亲本Jurkat或CCR8 KO TALL-1细胞结合(图4A)。与岩藻糖基化(WT)AC-277357/PR-1925514相似,ABBV-514还与TALL-1细胞上的内源CCR8结合(图4B)。

[0132] 岩藻糖基化WT PR-1925514和ABBV-514均介导ADCC,如在基于人Fc γ RIIIa报告细胞的生物测定中,使用与过表达人(图5A、图5B)或食蟹猴(图5C、图5D)CCR8的Jurkat细胞共培养的Fc γ RIIIa V158(图5A、图5C)或F158(图5B、图5D)等位基因变体报告系通过发光诱导所测量的。与未处理的共培养物相比,发光的倍数变化呈现为2-5次独立实验的平均值±SEM。与岩藻糖基化WT PR-1925514相比,ABBV-514表现出增加的ADCC活性,如通过ADCC报告因子生物测定所指示的。为了与以 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 表示的浓度进行比较,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗体浓度等于6.76nM。

[0133] 8.9. 实施例9:ABBV-514的原代细胞ADCC测定数据

[0134] 使用TALL-1细胞作为靶标并使用人原代NK细胞作为效应物,在基于细胞毒性的

ADCC测定中进一步评价ABBV-514的活性。使用六种NK细胞供体来源作为靶细胞，并使用以上讨论的类似方法经由流式细胞术评估TALL-1靶细胞的细胞死亡。ABBV-514介导所有六个供体NK细胞样本对表达CCR8的TALL-1细胞的ADCC(图6)。使用上述适合的程序经由流式细胞术评估人全血培养物中的ADCC活性。48小时后，分析具有ABBV-514的人全血培养物以评估总CD45+造血细胞中CD45RA低Treg的分数。CD45RA低Treg包括已知富含CCR8表达的活的CD45+、CD3+、CD4+、CD25+、CD127低、Foxp3+、CD45RA低细胞。评估来自11名健康供体的人全血细胞数据。在每个供体中，ABBV-514降低活CD45+细胞中CD45RA低Treg的百分比量(数据未示出)。

[0135] 8.10.实施例10:ABBV-514对CCL1配体阻滞的评估

[0136] 使用CCR8 β -抑制蛋白报告因子测定来确定ABBV-514是否阻断CCR8与其配体CCL1的相互作用(图7)。仅在比观察到结合或ADCC活性的浓度显著更高的抗体浓度下观察到在ABBV-514的存在下对CCL1介导的报告因子活化的抑制，观察到CCL1阻滞的EC₅₀为23.1 μ g/mL。

[0137] 9.示例性实施方案

[0138] 虽然已经图示和描述了各种特定实施方案，并且下文作为示范而示出了一些，但是应当理解，在不脱离本发明的精神和范围的情况下，可以进行各种改变。

[0139] 1.一种抗CCR8抗体，所述抗体包含(i)包含三个CDR的VH链；和(ii)包含三个CDR的VL链，其中：

[0140] VH CDR#1是GFIFSNAVMY (SEQ ID NO:1)；

[0141] VH CDR#2是RIKTKFNNYATYYADAVKG (SEQ ID NO:2)；

[0142] VH CDR#3是GDRNKPFAV (SEQ ID NO:3)；

[0143] VL CDR#1是RASTSVITLLH (SEQ ID NO:4)；

[0144] VL CDR#2是GASNLES (SEQ ID NO:5)；并且

[0145] VL CDR#3是QQSWNDPYT (SEQ ID NO:6)。

[0146] 2.根据实施方案1所述的抗CCR8抗体，其中所述抗体包含紧接在VH CDR#3之前的氨基酸序列CTA，其中所述抗体包含氨基酸序列CTAGDRNKPFAV (SEQ ID NO:14)。

[0147] 3.根据实施方案1所述的抗CCR8抗体，其中所述抗体包含：包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的重链可变区和包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0148] 4.根据实施方案1所述的抗CCR8抗体，其中所述抗体包含：包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链和包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的轻链。

[0149] 5.根据实施方案3所述的抗CCR8抗体，其中所述抗体是无岩藻糖基化的。

[0150] 6.一种组合物，所述组合物包含多种根据实施方案1所述的抗CCR8抗体。

[0151] 7.根据实施方案6所述的组合物，其中所述组合物中大于80%的所述抗CCR8抗体是无岩藻糖基化的。

[0152] 8.根据实施方案1所述的抗CCR8抗体，所述抗体为IgG。

[0153] 9.根据实施方案1所述的抗CCR8抗体，其中所述抗体包含含有Fc部分的人重链恒定区，其中所述Fc部分是人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM同种型。

[0154] 10.根据实施方案9所述的抗CCR8抗体，所述抗体包含κ轻恒定区。

[0155] 11.根据实施方案4所述的抗CCR8抗体，其中所述重链的C端赖氨酸被截短。

- [0156] 12. 根据实施方案1所述的抗CCR8抗体,其中所述抗体是人源化抗体。
- [0157] 13. 一种治疗实体瘤的方法,所述方法包括向有需要的患者施用根据实施方案6所述的组合物。
- [0158] 14. 一种包含编码抗CCR8抗体的核苷酸序列的多核苷酸,其中所述抗体包含(i)包含三个CDR的VH链;和(ii)包含三个CDR的VL链,其中:
- [0159] VH CDR#1是GFIFSNAVMY (SEQ ID NO:1);
- [0160] VH CDR#2是RIKTKFNNYATYYADAVKG (SEQ ID NO:2);
- [0161] VH CDR#3是GDRNKPFAY (SEQ ID NO:3);
- [0162] VL CDR#1是RASTSVITLLH (SEQ ID NO:4);
- [0163] VL CDR#2是GASNLES (SEQ ID NO:5);并且
- [0164] VL CDR#3是QQSWNDPYT (SEQ ID NO:6)。
- [0165] 15. 一种表达载体,所述表达载体包含根据实施方案14所述的多核苷酸。
- [0166] 16. 一种真核宿主细胞,所述真核宿主细胞用根据实施方案15所述的载体转染。
- [0167] 17. 根据实施方案16所述的真核宿主细胞,所述真核宿主细胞是哺乳动物宿主细胞。
- [0168] 18. 一种产生抗CCR8抗体的方法,所述方法包括:(a)培养根据权利要求15所述的真核宿主细胞以及(b)回收所述抗CCR8抗体。
- [0169] 19. 一种治疗实体瘤的方法,所述方法包括向有需要的患者施用根据实施方案6所述的组合物。
- [0170] 20. 一种具有一种或多种以下特性的抗CCR8抗体:
- [0171] (a)与食蟹猴CCR8的交叉反应性;
- [0172] (b)阻断CCL1/CCR8相互作用的能力差;
- [0173] (c)诱导ADCC的能力增强;
- [0174] (d)与Fc γ 受体的结合增强;以及
- [0175] (e)通过细胞因子释放测定确定的良好免疫安全性。
- [0176] 21. 一种具有以下特性的抗CCR8抗体:
- [0177] (a)与食蟹猴CCR8的交叉反应性;
- [0178] (b)阻断CCL1/CCR8相互作用的能力差;
- [0179] (c)诱导ADCC的能力增强;
- [0180] (d)与Fc γ 受体的结合增强;以及
- [0181] (e)通过细胞因子释放测定确定的良好免疫安全性。
- [0182] 22. 一种具有以下特性的抗CCR8抗体:
- [0183] (a)与食蟹猴CCR8的交叉反应性;
- [0184] (b)阻断CCL1/CCR8相互作用的能力差;
- [0185] (c)诱导ADCC的能力增强。
- [0186] 23. 根据实施方案19-21中任一项所述的抗CCR8抗体,所述抗体包含(i)包含三个CDR的VH链;和(ii)包含三个CDR的VL链,其中:
- [0187] VH CDR#1是GFIFSNAVMY (SEQ ID NO:1);
- [0188] VH CDR#2是RIKTKFNNYATYYADAVKG (SEQ ID NO:2);

- [0189] VH CDR#3是GDRNKPFA (SEQ ID NO:3)；
- [0190] VL CDR#1是RASTS VITLLH (SEQ ID NO:4)；
- [0191] VL CDR#2是GASNLES (SEQ ID NO:5)；并且
- [0192] VL CDR#3是QQSWNDPYT (SEQ ID NO:6)。

[0193] 24.根据实施方案20-22中任一项所述的抗CCR8抗体,其中所述抗体包含:包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的重链可变区和包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0194] 25.根据实施方案20-22中任一项所述的抗CCR8抗体,其中所述抗体包含:包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的重链和包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的轻链。

[0195] 26.根据实施方案20-22中任一项所述的抗CCR8抗体,其中所述抗体是无岩藻糖基化的。

[0196] 27.根据实施方案20-22中任一项所述的抗CCR8抗体,所述抗体包含(i)包含三个CDR的VH链;和(ii)包含三个CDR的VL链,其中:

- [0197] VH CDR#1是GFIFSNAVMY (SEQ ID NO:1)；
- [0198] VH CDR#2是RIKTKFNNYATYYADAVKG (SEQ ID NO:2)；
- [0199] VH CDR#3是GDRNKPFA (SEQ ID NO:3)；
- [0200] VL CDR#1是RASTS VITLLH (SEQ ID NO:4)；
- [0201] VL CDR#2是GASNLES (SEQ ID NO:5)；并且
- [0202] VL CDR#3是QQSWNDPYT (SEQ ID NO:6)；
- [0203] 并且其中所述抗体是无岩藻糖基化的。

[0204] 28.一种治疗实体瘤的方法,所述方法包括向有需要的患者施用根据实施方案6所述的组合物和包含抗PD-1抗体的组合物的组合。

[0205] 29.根据实施方案28所述的方法,其中所述抗PD-1抗体选自由以下组成的组:布格利单抗、帕博利珠单抗、纳武单抗、西米普利单抗和多塔利单抗。

[0206] 30.根据实施方案29所述的方法,其中所述抗PD-1抗体是布格利单抗。

[0207] 31.根据实施方案29所述的方法,其中所述抗PD-1抗体是帕博利珠单抗。

[0208] 32.一种治疗实体瘤的方法,所述方法包括向有需要的患者施用根据实施方案6所述的组合物和包含抗PD-L1抗体的组合物的组合。

[0209] 33.根据实施方案32所述的方法,其中所述抗PD-L1选自由以下组成的组:阿特珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗。

[0210] 34.根据实施方案33所述的方法,其中所述抗PD-L1抗体是阿特珠单抗。

[0211] 35.根据实施方案6所述的组合物,其中所述组合物中约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、或约100%或更多的所述抗CCR8抗体是无岩藻糖基化的。

[0212] 36.根据实施方案2-4中任一项所述的抗CCR8抗体,其中所述抗体是无岩藻糖基化的。

[0213] 37.一种组合物,所述组合物包含多种根据实施方案36所述的抗CCR8抗体。

[0214] 38.根据实施方案37所述的组合物,其中所述组合物中约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、或约100%或更多的所述抗CCR8抗体是无岩藻糖基化的。

[0215] 39.一种抗CCR8抗体,所述抗体包含两条重链和两条轻链,每条重链包含如SEQ ID

NO:9所示的氨基酸序列,每条轻链包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中所述抗体是无岩藻糖基化的。

[0216] 40.一种组合物,所述组合物包含多种根据实施方案39所述的抗CCR8抗体。

[0217] 41.根据实施方案40所述的组合物,其中所述组合物中约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、或约100%或更多的所述抗CCR8抗体是无岩藻糖基化的。

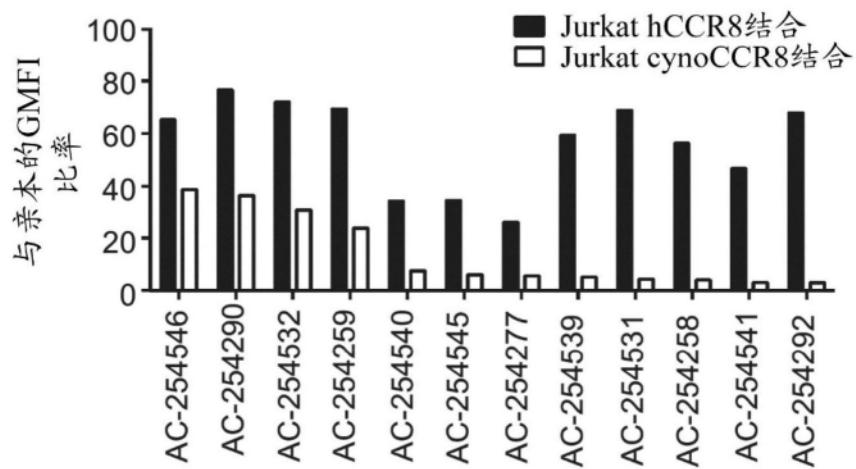


图1

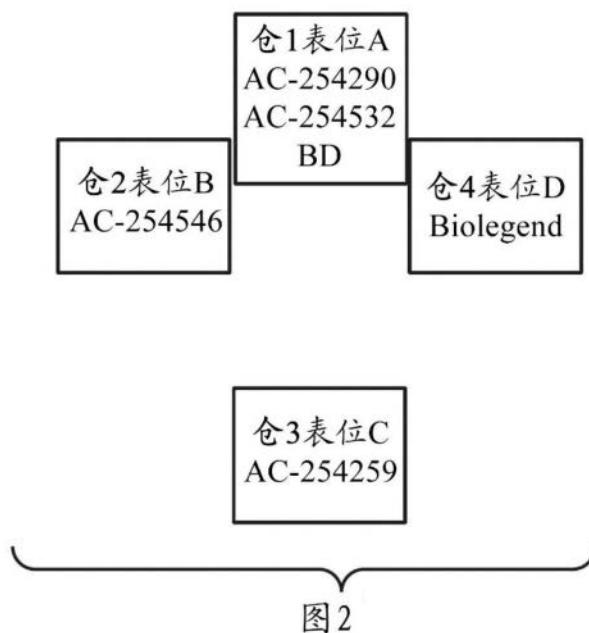


图2

图2

ABBV-514 序列信息

>PR-1925514_轻链huCCR8 (AC-277357) [hu IgG1/K] (VL结构域加下划线, 恒定区为粗体)

ETVVTQSPATLSSLSPGERATLSQRASTSVITLLHWFQQQKPGQAPRLLIHGASNI**ESRVPARFSGSGSGTIDFTLTISLEPEDFATYFCQQ
SWNDP**Y**T**F**GQGT**K**L**E**I**R**T**V**A**P**S**V**FI**PPS**D**E**Q**L****K****S****G****T**A**S**VCLNN**F**P**R****E****A****K**QW**K**VD**N****A****L****Q****S****G****N****S****Q****E****S**VT**E****Q****D****S****K****D****S****T****Y****S****L****

S**S****T****L****S****K****A****D****Y****E****K****H****K****V****Y****A****C****E****V****T****H****Q****G****L****S****S****P****V****T****K****S****F****N****R****G****E****C**

>PR-1925514_重链huCCR8 (AC-277357) [hu IgG1/K] (VH结构域加下划线, 恒定区为粗体)

E**V****Q****L****V****E****S****G****G****L****V****Q****P****G****G****S****L****K****L****S****C****A****A****S****G****F****I****F****S****N****A****V****N****M****Y**W**V****R****Q****A****S****G****K****G****L****E****W****V**A**F****R****I****K****T****K****F****N****N****Y**A**T****Y****A****D****A****V****K****G****R****F****T****I****S****R****D****D****S****K****N****M****V****Y****L****Q**
M**N****S****L****K****T****E****D****T****A****V****V****Y****C****T****Ä****G****D****R****N****K****P****F****Ä****Y**W**G****Q****G****T****L****V****T****V****S**A**S****T****K****G****P****S****V****F****L****A****P****S****K****S****T****S****G****G****T****A****A****G****C****L****V****K****D****S****K****D****T****L****S****G****A****L****T**
G**V****H****T****F****P****A****V****L****Q****S****S****G****L****Y****S****L****S****W****T****V****P****S****S****L****G****T****Q****T****Y****I****C****N****V****N****H****K****P****S****N****T****K****V****D****K****K****V****E****P****K****S****C****D****K****T****H****T****C****P****P****C****A****P****E****L****L****G****G****P****S****V****F****L****F****P****P****K****P****K****D****T****L**
M**I****S****R****T****P****E****V****T****C****V****V****V****D****V****S****H****E****D****P****E****V****K****F****N****W****Y****V****D****G****V****E****V****H****N****A****K****T****K****P****R****E****E****Q****Y****N****Y****S****T****Y****R****V****V****S****V****L****T****V****L****H****Q****D****W****L****N****G****K****E****Y****K****C****K****V****S****N****K****A****L****P****A****I****E**
T**I****S****K****A****K****G****Q****P****R****E****P****Q****V****Y****T****L****P****S****R****E****E****M****T****K****N****Q****V****S****L****T****C****L****V****K****G****F****P****S****D****I****A****V****E****W****E****S****N****G****Q****P****E****N****Y****K****T****T****P****V****L****D****G****S****F****F****L****Y****S****K****L****T****V****D****K****S****R****W****Q**
Q**G****N****V****F****S****C****S****V****M****H****E****A****L****H****N****H****T****Q****K****S****L****S****P****G****K**

CDR1
CDR2
CDR3
无岩藻糖基化残基

图3

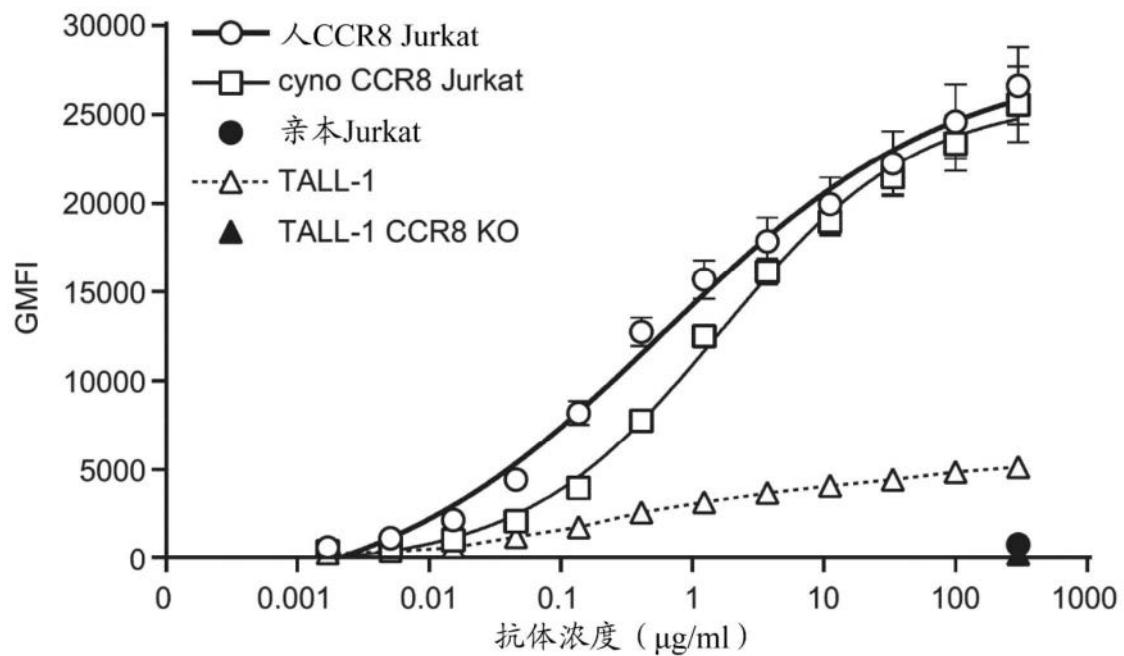


图4A

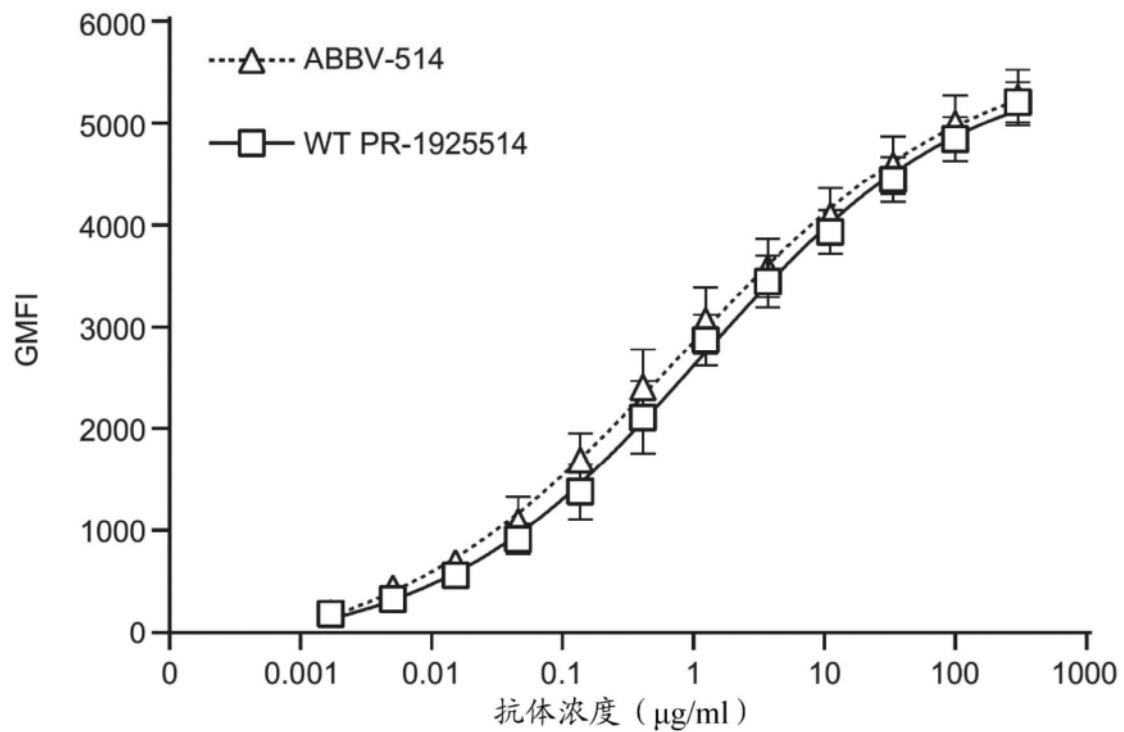


图4B

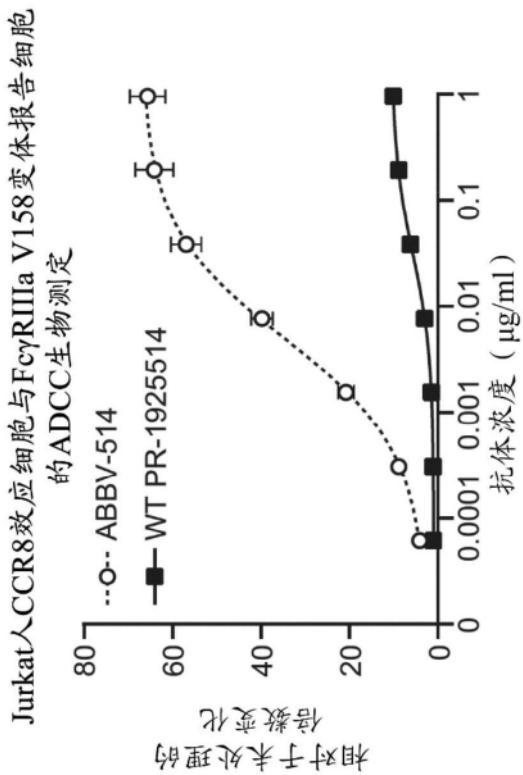


图5A

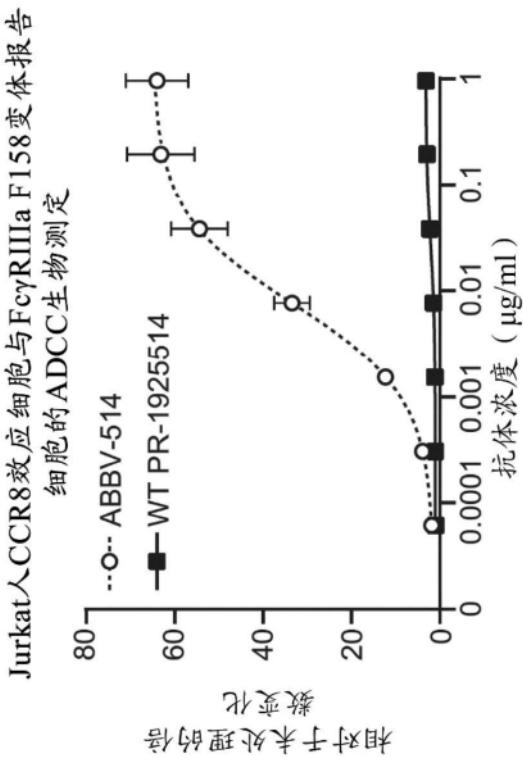


图5B

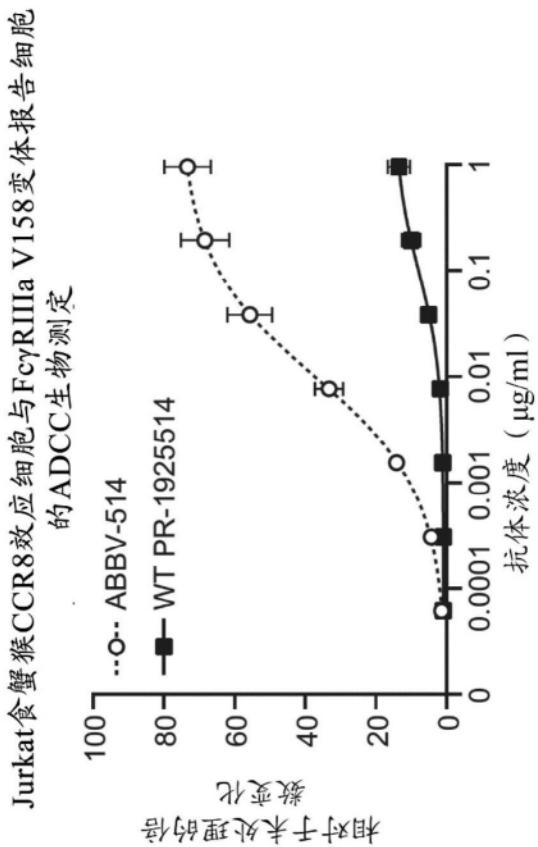


图5C

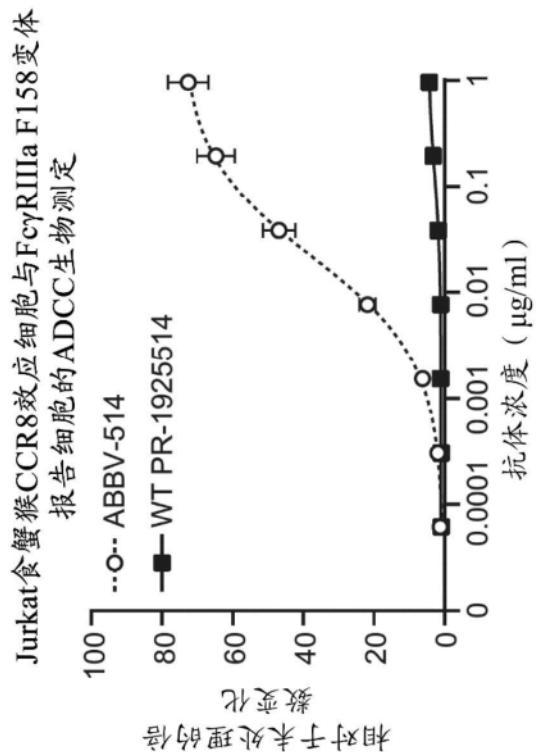


图5D

NK细胞ADCC测定 用纯化的人NK细胞TALL-1
作为靶标的ADCC测定

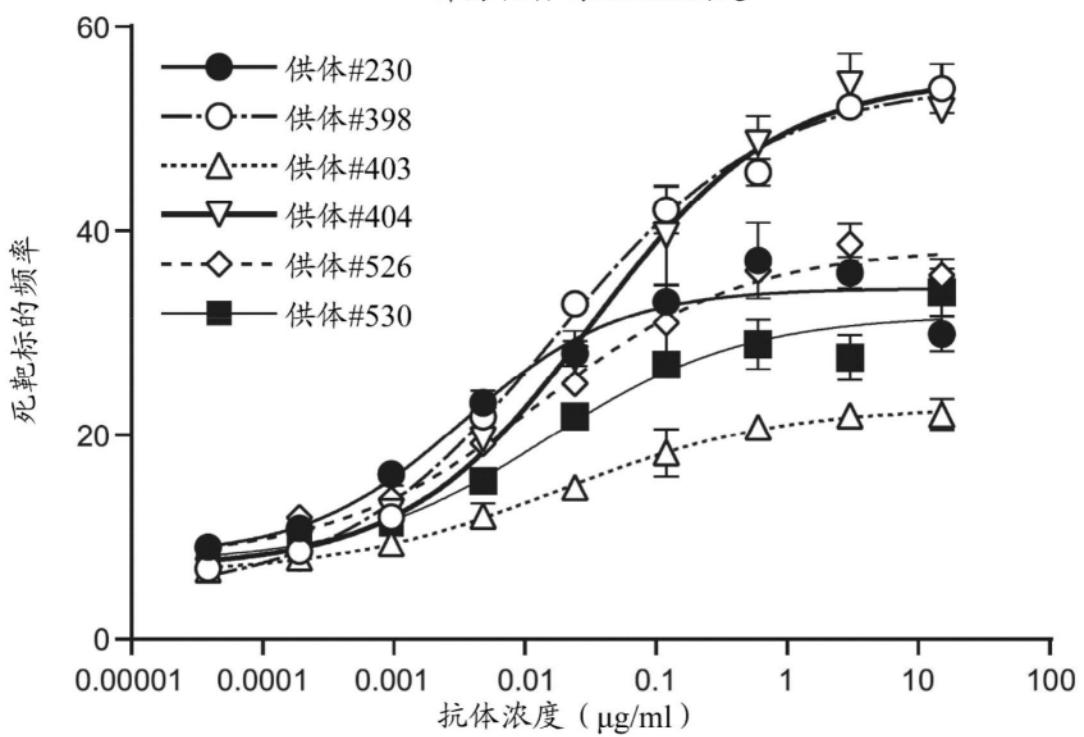


图6

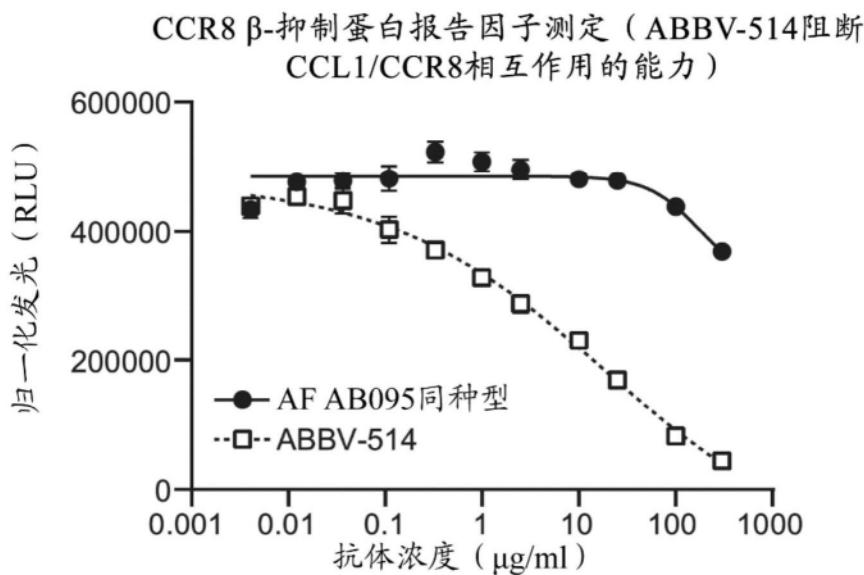


图7