

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7638935号
(P7638935)

(45)発行日 令和7年3月4日(2025.3.4)

(24)登録日 令和7年2月21日(2025.2.21)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
		Z N A	
		N	
		Z	
請求項の数 6 外国語出願 (全26頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2022-119632(P2022-119632)	(73)特許権者	512212195
(22)出願日	令和4年7月27日(2022.7.27)		アッヴィ・インコーポレイテッド
(65)公開番号	特開2023-18678(P2023-18678A)		アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 6 4
(43)公開日	令和5年2月8日(2023.2.8)		、ノース・シカゴ、ノース・ワウキガン
審査請求日	令和6年8月30日(2024.8.30)		・ロード・1
(31)優先権主張番号	63/226,118	(74)代理人	110001173
(32)優先日	令和3年7月27日(2021.7.27)		弁理士法人川口国際特許事務所
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ジュリー・エル・ウィルスバチャール
早期審査対象出願			アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 7 3
			、ラウンド・レイク・ビーチ、ブルーベ
			ル・コート・2 5 6 4
		(72)発明者	アマンダ・エム・シュミット・ポースチ
			ャン
			アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 6 1
			、バーノン・ヒルズ、サウス・ディアー
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗 C C R 8 抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 3 つの C D R を含む V H 鎖及び (i i) 3 つの C D R を含む V L 鎖を含む、抗 C C R 8 抗体であって、
V H C D R # 1 が、 G F I F S N A V M Y (配列番号 1) であり、
V H C D R # 2 が、 R I K T K F N N Y A T Y Y A D A V K G (配列番号 2) であり、
V H C D R # 3 が、 G D R N K P F A Y (配列番号 3) であり、
V L C D R # 1 が、 R A S T S V I T L L H (配列番号 4) であり、
V L C D R # 2 が、 G A S N L E S (配列番号 5) であり、及び
V L C D R # 3 が、 Q Q S W N D P Y T (配列番号 6) である、抗 C C R 8 抗体。

10

【請求項 2】

配列番号 7 として記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 8 として記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載の抗 C C R 8 抗体。

【請求項 3】

配列番号 9 として記載されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 1 0 として記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項 1 に記載の抗 C C R 8 抗体。

【請求項 4】

脱フコシル化されている、請求項 3 に記載の抗 C C R 8 抗体。

【請求項 5】

複数の抗 C C R 8 抗体を含む組成物であって、それぞれの抗 C C R 8 抗体が、配列番号

20

9として記載されるアミノ酸配列を有する2つの重鎖、及び配列番号10として記載されるアミノ酸配列を有する2つの軽鎖を含む、組成物。

【請求項6】

組成物中の抗CCR8抗体の80%超が、脱フコシル化されている、請求項5に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、SL-ANTI-CCR8ANTIBODIESと名付けられた、2022年7月25日に作成され、17キロバイトのサイズを有するxmlファイルとして電子的に提出された配列表を含む。配列表は、参照により本明細書に組み込む。

10

【0002】

本出願は、米国特許法第119条(e)の下、2021年7月27日に出願された米国特許仮出願第63/226,118号の利益を主張し、この開示は、その全体を参照により本明細書に組み込む。

【0003】

本出願は、とりわけ、新規の抗CCR8抗体並びにこれを作製及び使用方法に関する。

【背景技術】

【0004】

腫瘍において、制御性T細胞(Treg)は、抗腫瘍免疫応答を防ぐことで知られる鍵となる抑制性集団である。腫瘍内Tregの存在の増加は、いくつかのがんにおいて患者の転帰が不良となることに関連している(Shangら、Nature Sci. Reports、2015; Fridmanら、Nat Rev Clin Oncol、2017; Bruniら、Nat Rev Cancer、2020)。ケモカイン受容体8(CCR8)は、いくつかのヒトがんにおいて腫瘍内Tregによってユニークに発現する細胞表面タンパク質である(Plitasら、Immunity 2016; De Simoneら、Immunity 2016)。このためCCR8は、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)を介して腫瘍内Tregの選択的枯渇を媒介し、抗腫瘍免疫を増強する魅力的な標的となる。

20

30

【0005】

Treg枯渇は長い間、研究されているが、このような治療のほとんどが、腫瘍浸潤エフェクターT細胞集団及び/又は腫瘍環境外部のTreg上で標的発現するために有効性が限られている。腫瘍微小環境における他の鍵となるエフェクターT細胞集団又は末梢Tregを枯渇させずに腫瘍内免疫抑制性Tregの死を引き起こす、モノクローナル抗体治療薬に対する当技術分野における必要性が残存している。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【文献】Shangら、Nature Sci. Reports、2015

40

【文献】Fridmanら、Nat Rev Clin Oncol、2017

【文献】Bruniら、Nat Rev Cancer、2020

【文献】Plitasら、Immunity 2016

【文献】De Simoneら、Immunity 2016

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

(発明の要旨)

抗CCR8モノクローナル抗体は、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)を介して腫瘍内Tregの選択的枯渇を媒介することがわかっている。CCR8が、腫瘍浸潤Tre

50

gにより優先的に発現し、末梢血Tregにおいて又は有益なエフェクターT細胞集団により高度には発現しないため、抗CCR8抗体は、腫瘍内Tregを枯渇させ、抗腫瘍免疫を増強する。抗CCR8抗体単独療法は、独立して有効であるが、腫瘍におけるTregの特異的除去によって、抗腫瘍免疫応答の同時刺激を目標とした適切な併用療法的手段に適した環境がもたらされる。例えば、抗PD-1などのチェックポイント阻害剤との組合せが、Treg枯渇時に潜在的抗腫瘍免疫を十分に駆動するのに必要とされ得る。

【課題を解決するための手段】

【0008】

したがって、CCR8に特異的に結合し、CCR8発現TregのADCCを媒介する、モノクローナルヒト化抗体のためのアミノ酸配列を提供する。抗体は構造的に、CCR8に特異的に結合する相補性決定領域(CDR)を含む、可変重鎖及び可変軽鎖からなる。また、抗体は、結晶化可能断片領域(Fc)を含むヒト重鎖定常領域、及び軽鎖定常領域を含む。抗体のアミノ酸配列によりコードされる、このような構造的エレメントは、患者における固形腫瘍の治療において有効な医薬組成物を、単独療法として又は他の治療薬と組み合わせて含む。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】ヒト又はカニクイザルCCR8を発現するジャーカット細胞に対するキメララット/hIgG1ヒトCCR8特異的キメラmAbの結合を示す図である。

【図2】エピトープ結合実験の結果を示す図である。

【図3】ABBV-514の重鎖及び軽鎖配列を示す図である。

【図4A】内因性CCR8を発現するTALL-1細胞又はTALL-1CCR8ノックアウト細胞に対して及びジャーカット親細胞又はヒト若しくはcytoCCR8を高発現する細胞に対する脱フコシル化ABBV-514の結合用量応答曲線を示す図である。

【図4B】TALL-1細胞に対するフコシル化(WT PR-1925514)対脱フコシル化ABBV-514の結合を示す図である。

【図5A】フコシル化(WT PR-1925514)対脱フコシル化ABBV-514のADCCレポーターバイオアッセイデータを示す図である。

【図5B】フコシル化(WT PR-1925514)対脱フコシル化ABBV-514のADCCレポーターバイオアッセイデータを示す図である。

【図5C】フコシル化(WT PR-1925514)対脱フコシル化ABBV-514のADCCレポーターバイオアッセイデータを示す図である。

【図5D】フコシル化(WT PR-1925514)対脱フコシル化ABBV-514のADCCレポーターバイオアッセイデータを示す図である。

【図6】精製NKエフェクター細胞及びTALL-1標的細胞によるADCCアッセイの結果を示す図である。

【図7】CCR8へのCCL1結合に対するABBV-514の作用を示すCCR8ベータ-アレスチンレポーターアッセイの結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

Tregは、腫瘍内免疫抑制作用を有するCD4+T細胞のサブセットである。Tregは、CD4+T細胞及びCD8+T細胞の活性化、増殖及びサイトカイン産生を抑制して、有害な自己免疫応答を防ぐ。しかし、Tregは、腫瘍免疫をも抑制し、高レベルの腫瘍内Tregは、いくつかのがんにおいて負の転帰と関連している。

【0011】

CCR8は、2型ヘルパーT(Th2)リンパ球免疫応答及び皮膚へのT細胞輸送の関連において走化性及び細胞/細胞相互作用を媒介する7回膜貫通タンパク質からなるC-Cモチーフケモカイン受容体である。CCR8欠損マウスは、特定のTh2関連前臨床モデルにおいて強固なTh2応答を開始することができないことを除いて、生存可能、繁殖性であり、ほとんどの場合は正常である(Chensueら、J Exp Med 5、20

10

20

30

40

50

01)。CCR8と主に結合するリガンドはCCL1であるが、CCL18（ヒト）及びCCL8（マウス）も、この受容体のリガンドである。

【0012】

腫瘍に浸潤するCCR8発現Tregは、高度に活性化され、免疫抑制性の表現型を示す。CCR8ノックアウトマウスにおける腫瘍研究では、CCR8発現の減少は、腫瘍微小環境へのTregの動員、活性化状態又は抑制能に影響しないことが示されている（Van Dammeら、J Immunother Cancer、9（2）、2021）。むしろ、CCR8発現は、高度に抑制性のTregのマーカーである。したがって、CCR8発現Tregの枯渇は、抗腫瘍の利益をもたらす。

【0013】

CCR8特異的代替抗体は、ADCCを介して腫瘍内Tregの選択的枯渇を媒介する。加えて、抗CCR8代替抗体は、腫瘍特異的CD8+エフェクターTリンパ球の循環の頻度を著しく増強する。このような作用は、同系腫瘍マウスモデルにおいて、有効性と相関する（Campbellら、Cancer Research 81、2021）。

【0014】

本発明者らは、例えば、腫瘍内Tregなどの細胞表面上で発現するCCR8に特異的に結合するモノクローナル治療抗体を開発した。実施形態では、抗体は、重鎖1つ及び軽鎖1つの2つの可変鎖からなる。各可変鎖上には、抗体がCCR8に結合することが可能となる3つのCDRが存在する。両可変鎖上には、合計6つの異なるCDRが存在する。加えて、抗体は、免疫グロブリンクラスG1（IgG1）のヒトFcを含むヒト重鎖定常領域を含む。本明細書に記載の抗CCR8抗体は、フコシル化又は脱フコシル化されて、インビトロでの機能性、免疫安全性及び薬物様特性を実証することができる。

【0015】

一部の実施形態では、抗体は、脱フコシル化されているIgG Fc定常領域を含む。実施形態では、脱フコシル化Fc定常領域は、IgG1である。脱フコシル化は、当技術分野において公知の技術により実行し得る。例えば、Mol Cancer Ther（2020）19（5）：1102～1109及びPNAS（2013）110（14）5404～5409を参照されたい。例えば、GDP-マンノース4，6-デヒドラターゼの欠乏により、例えば、GDP-フコース形成が欠損した細胞株における抗体の産生、フコシルトランスフェラーゼのレベルが低下した細胞における抗体の産生、GDP-フコース輸送体のレベルが低下した細胞における抗体の産生、1，4-マンノシル-糖タンパク質4-β-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（GnT-III）を高発現する細胞における抗体の産生、又は細菌GDP-6-デオキシ-D-リキソ-4-ヘキスロースレダクターゼ（RMD）を発現する細胞における抗体の産生が挙げられる。実施形態では、本発明の脱フコシル化抗CCR8抗体の産生に使用する細胞は、シュードモナス（Pseudomonas）RMDを発現するように改変したCHO細胞である。抗体の脱フコシル化の程度は、当技術分野において公知の技術により定量することができる。

【0016】

ヒト及びカニクイザルCCR8と交差反応する抗CCR8抗体を得るために、ヒト又はカニクイザルのいずれかのCCR8を高発現するジャーカット細胞に結合するマウス-ヒト（ラット/hIgG1）キメラ抗体の能力を評価した。結果は、当技術分野において公知の技術により実行するフローサイトメトリーによって分析した。結果として、最終抗CCR8抗体は、ヒト及びカニクイザルCCR8と交差反応し、両方の種においてADCCを媒介するが、マウス、ラット又はウサギCCR8には結合しない。

【0017】

特定の実施形態では、本発明の脱フコシル化抗体は、この抗体のフコシル化形態と比較して、IgGの受容体の活性化に対する高い親和性、並びに精製ナチュラルキラー細胞又は末梢血単核細胞（PBMC）ADCCアッセイにおける活性の増強を有する。抗CCR8抗体のADCC活性は、当技術分野において公知のADCCバイオアッセイ技術を使用して実証することができる。例えば、ヒト又はカニクイザルCCR8発現ジャーカット細

10

20

30

40

50

胞と培養したヒト FcγRIIIa V158 又は F158 アレルバリエントレポーター株では、抗CCR8抗体は、当技術分野において公知の技術を使用する発光誘導により測定した場合、ADCCを引き起こした。

【0018】

加えて、本明細書に記載の抗体は、CCR8にも結合するが、結合又はADCC活性に対するものよりも実質的に高いEC50でのみ結合するCCL1などの天然に存在する他のリガンドの有効性に干渉する。この検査は、当技術分野において公知の技術、例えば、ベータ-アレスチンレポーターアッセイにより実行した。

【0019】

本明細書において使用する場合、「抗体」(Ab)の用語は、特定の抗原、例えば、CCR8に特異的に結合する、免疫グロブリン分子を指す。本開示の抗CCR8抗体は、Treg上のヒトCCR8に結合し、これにより免疫系を調節する。本開示の抗CCR8抗体は、軽鎖及び重鎖の両可変ドメイン内に、超可変領域としても知られる相補性決定領域(CDR)を含む。可変ドメインのさらに高度に保存された部分は、フレームワーク(FR)と呼ぶ。当技術分野において公知のように、抗体の超可変領域を描くアミノ酸部分/境界は、これらの関連及び当技術分野における公知の種々の定義に応じて異なり得る。可変ドメイン内の一部の位置は、このような位置が、一連のある基準の下では超可変領域内に存在すると思われるが、一連の別の基準の下では超可変領域の外部に存在すると思われるため、ハイブリッド高頻度可変位置であると考えることができる。また、このような位置の1つ以上は、伸長した超可変領域において見出すことができる。本開示は、このようなハイブリッド超可変位置において修飾を含む抗体を提供する。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、ほとんどの場合では、シート構造に連結する、及び一部の 경우에는 シート構造の部分を形成するループを形成している、3つのCDRにより連結したシート構造を組み入れた、4つのFR領域をそれぞれ含む。各鎖のCDRは、FR領域によってごく近接して結合し、他の鎖のCDRとともに、抗体の標的結合部位の形成に寄与する。Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health、Bethesda、Md. 1987)を参照されたい。

【0020】

本開示の抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、遺伝子改変及び/又はその他天然に修飾された抗体であり、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、一本鎖抗体等を含み得るが、これらに限定されない。種々の実施形態では、抗体は、抗体の定常領域のすべて又は部分を含む。一部の実施形態では、定常領域は、IgA(例えば、IgA1又はIgA2)、IgD、IgE、IgG(例えば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4)及びIgMから選択されるアイソタイプである。特定の実施形態では、本明細書に記載の抗CCR8抗体は、IgG1を含む。他の実施形態では、抗CCR8抗体は、IgG2を含む。さらに他の実施形態では、抗CCR8抗体は、IgG4を含む。本明細書において使用する場合、抗体の「定常領域」は、天然定常領域、アロタイプ又はバリエントを含む。

【0021】

抗CCR8抗体の軽鎖定常領域は、カッパ()軽鎖領域又はラムダ()領域であり得る。軽鎖領域は、公知のサブタイプ、例えば、1、2、3又は4のいずれか1つであり得る。一部の実施形態では、抗CCR8抗体は、カッパ()軽鎖領域を含む。

【0022】

「モノクローナル抗体」の用語は、本明細書において使用する場合、ハイブリドーマ技術により産生された抗体に限定されない。モノクローナル抗体は、利用可能な任意の手段による又は当技術分野において公知の、任意の真核、原核又はファージクローンを含む、単一クローンに由来する。本開示により有用なモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え及びファージディスプレイ技術又はこれらの組合せの使用を含む、当技術分野において公知の多種多様な技術を使用して調製することができる。

【0023】

10

20

30

40

50

「キメラ」抗体の用語は、本明細書において使用する場合、ラット又はマウス抗体などの非ヒト免疫グロブリンに由来する可変配列を有する抗体、及びヒト免疫グロブリン鑄型から典型的に選択されるヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体を指す。

【 0 0 2 4 】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、少なくとも1つ及び典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、このCDR領域のすべて又は実質的にすべては非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、このFR領域のすべて又は実質的にすべては、ヒト免疫グロブリン配列のFR領域である。また、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的には、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の少なくとも一部を含み得る。

10

【 0 0 2 5 】

「ヒト抗体」は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、ヒト免疫グロブリンライブラリーから、又は1つ以上のヒト免疫グロブリンを遺伝子導入し、機能性の内因性免疫グロブリンを発現しない動物から単離した抗体を含む。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを使用するファージディスプレイ方法を含む、当技術分野において公知の種々の方法により作製することができる。

【 0 0 2 6 】

本開示の抗CCR8抗体は、完全長（インタクト）抗体分子を含む。

【 0 0 2 7 】

抗CCR8抗体は、定常領域により媒介される少なくとも1つの生物学的エフェクター機能を変化させるように配列が修飾されている抗体であり得る。例えば、本明細書に記載の抗CCR8抗体は、定常領域により媒介される少なくとも1つの生物学的エフェクター機能を獲得又は非修飾抗体と比較して向上させて、例えば、FcR相互作用を増強（例えば、米国特許出願第2006/0134709号を参照）又はADCCを媒介する抗体の能力を増強するように修飾されている抗体を含む。例えば、本開示の抗CCR8抗体は、FcRI、FcRIIA、FcRIIB、FcRIIIA及び/又はFcRIIIBに、対応する非修飾定常領域よりも高い親和性で結合する定常領域を有し得る。本開示の抗CCR8抗体は、修飾Fc領域を有し、ADCC応答の増強を媒介する抗体であってもよく、この場合、ADCC応答は、同一の可変領域（すなわち、VH及びVL）及び野生型IgG1Fc領域（すなわち、野生型CL、CH1、CH2及びCH3）を有する抗体に関して増強される。ADCCの増強が可能なFc修飾、例えば、アミノ酸配列変異は、当技術分野において公知であり、次の組の変異：S239D/I332E；F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L；S239D/I332E/A330L；及びS298A/E333A/K334Aを含み得る。

20

30

【 0 0 2 8 】

ヒトIgG4定常領域を含む抗CCR8抗体は、Fabアーム交換を防ぐことが報告されているS228P変異を含み得る。例えば、Silva, JP J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y , 2 9 0 (9) , 5 4 6 2 ~ 5 4 6 9 (2 0 1 5) を参照されたい。

【 0 0 2 9 】

一部の実施形態では、抗CCR8抗体は、例えば、FcRn相互作用に関与する特定の領域における免疫グロブリン定常領域セグメントを変異させることにより、胎児性Fc受容体、FcRnに対するこれらの結合親和性を上昇又は低下させる修飾を含む。特定の実施形態では、IgGクラスの抗CCR8抗体は、重鎖定常領域のアミノ酸残基250、314及び428の少なくとも1つを単独又はこれらの任意の組合せで置換するように変異させる。250番目では、置換するアミノ酸残基は、スレオニン以外の任意のアミノ酸残基であってもよく、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、バリン、トリプトファン又はチロシンを含むが、これらに限定されない。314番目では、置換するアミノ酸残基は、ロイ

40

50

シン以外の任意のアミノ酸残基であってもよく、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、スレオニン、バリン、トリプトファン又はチロシンを含むが、これらに限定されない。428番目では、置換するアミノ酸残基は、メチオニン以外の任意のアミノ酸残基であってもよく、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、スレオニン、バリン、トリプトファン又はチロシンを含むが、これらに限定されない。Fcエフェクター機能を修飾することで知られている、例となる置換は、Fc置換M428Lであり、これは、Fc置換T250Qと併せて生じ得る。適するアミノ酸置換のさらなる特異的組合せは、米国特許第7,217,797号の表1に同定されている。このような変異によってFcRnへの結合が向上し、これにより抗体が分解から保護され、この半減期が向上する。

10

【0030】

ヒトCCR8に対する高親和性を有する抗CCR8抗体は、治療的及び診断的使用に望まれ得る。したがって、本開示は、ヒトCCR8に対する高い結合親和性を有する抗体を企図する。特定の実施形態では、抗CCR8抗体は、少なくとも約100nMの親和性でヒトCCR8に結合するが、例えば、少なくとも約90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.1nM、0.01nMの高い親和性又はこれらよりさらに高い親和性を示し得る。一部の実施形態では、抗体は、約1pM～約10nM、約100pM～約10nM、約100pM～約1nMの範囲の親和性、又は前述の値のいずれかの間の範囲に及ぶ親和性でヒトCCR8に結合する。

20

【0031】

一部の実施形態では、6つの異なる相補性決定領域(CDR)を2組、2つの異なる可変領域を2組、2つの完全重鎖、2つの完全軽鎖及びヒト重鎖定常領域を含む、モノクローナル抗CCR8抗体を本発明において提供する。

【0032】

一部の実施形態では、抗体は、ケモカイン受容体8に結合する組換え、脱フコシル化、ヒト化、IgG1カッパモノクローナル抗体である。

30

【0033】

実施形態では、抗体は、次の配列を含むCDR6つを含む。

【0034】

【化1】

CDR-H1: GFIFSNVAMY (配列番号1)
CDR-H2: RIKTKFNNTYATYYADAVKG (配列番号2)
CDR-H3: GDRNKPFAAY (配列番号3)
CDR-L1: RASTSVITLLH (配列番号4)
CDR-L2: GASNLES (配列番号5)
CDR-L3: QQSWNDPYT (配列番号6)

40

【0035】

一部の実施形態では、本開示の抗体は、配列番号1として示されるアミノ酸配列を有するCDR-H1、配列番号2として示されるアミノ酸配列を有するCDR-H2、配列番号3として示されるアミノ酸配列を有するCDR-H3、配列番号4として示されるアミノ酸配列を有するCDR-L1、配列番号5として示されるアミノ酸配列を有するCDR-L2及び配列番号6として示されるアミノ酸配列を有するCDR-L3を含む。

【0036】

50

一部の実施形態では、本開示の抗体は、配列番号 7 として示されるアミノ酸配列：

【 0 0 3 7 】

【 化 2 】

EVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFIFSNVVMYWVRQA SGKGLEWVARIKTKFNYYAT
YYADAVKGRFTISRDDSKNM VYLQMNSLKTEDTAVYYCTA GDRNKPFAYWGQGLTVTVSS
(配列番号 7)

を含む重鎖可変領域、及び配列番号 8 として示されるアミノ酸配列：

【 0 0 3 8 】

【 化 3 】

ETVVTQSPATLSLSPGERAT LSCRASTSVITLLHWFQQKP GQAPRLLIHGASNLESRVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFATYFCQSWNDPYTFGQ GTKLEIK (配列番号 8).

を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 0 3 9 】

一部の実施形態では、本開示の抗体は、配列番号 9 として示されるアミノ酸配列（定常領域は太字、可変重鎖ドメインは下線、C D R は下線を引いた太字のイタリック体（表示順にそれぞれ配列番号 1 ~ 3 として開示））：

【 0 0 4 0 】

【 化 4 】

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFIFSNVVMYWVRQASSGKGLEWVARIKTKFNYYATYYA
DAVKGRFTISRDDSKNMVYLQMNSLKTEDTAVYYCTAGDRNKPFAYWGQGLTVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

（配列番号 9 として開示される完全長配列）を含む重鎖、及び配列番号 10 として示されるアミノ酸配列（定常領域は太字、可変軽鎖ドメインは下線、C D R は下線を引いた太字のイタリック体（表示順にそれぞれ配列番号 4 ~ 6 として開示される C D R 配列））：

【 0 0 4 1 】

【 化 5 】

ETVVTQSPATLSLSPGERATLSCRASTSVITLLHWFQQKPGQAPRLLIHGASNLESRVPARFSGSG
SGTDFTLTISSLEPEDFATYFCQQSWNDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

（配列番号 10 として開示される完全長配列）を含む軽鎖を含む。

【 0 0 4 2 】

実施形態では、本開示の抗体は、配列番号 10 による軽鎖、及び C 末端のリジンが切断された重鎖、例えば、C 末端のリジンが切断された配列番号 9 による重鎖：

【 0 0 4 3 】

10

20

30

40

50

【化 6】

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFIFSNAVMYWVRQASGKGLEWVARIKTKFNNYATYYA
DAVKGRFTISRDDSKNMVYLQMNLSLKTEDTAVYYCTAGDRNKPFAYWGQGLTVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
HEALHNHYTQKSLSLSPG

10

(配列番号 1 1 として開示される末端リジン切断配列) を含む。

【 0 0 4 4 】

一実施形態では、本開示の抗体の重鎖は、次のヌクレオチド配列 (配列番号 1 2 として開示される完全長配列) によりコードされる。

【 0 0 4 5 】

【化 7】

ATGGAATTCGGCCTGAGCTGGCTGTTCTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAAGTCC
AGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAGCTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCATCTTCAGCAACGCCGTGATGTACTGGGTCCGACAGGCCTCTGGCAAAGG
CCTGGAATGGGTCGCCAGAATCAAGACCAAGTTCAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGAC
GCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACATGGTGTACCTGCAGA
TGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACAGCCGGCGACAGAAACAA
GCCCTTTGCCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTTACCGTTAGCTCTGCCTCCACCAAGGGC
CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCC
TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGG
CGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC
TTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG
TCAGTCTTCTCTTCCCCCCTCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA
CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT
GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAATGA

20

30

40

分泌シグナルペプチドはイタリック体であり、最終の終止コドン (T G A) を含み、定常

50

領域は太字であり、C D R には下線を引く。

【 0 0 4 6 】

一実施形態では、本開示の抗体の軽鎖は、次のヌクレオチド配列（配列番号 1 3 として開示される完全長配列）によりコードされる。

【 0 0 4 7 】

【 化 8 】

ATGGACATGCGGGTGGCCGCCAGCTGCTGGGACTTCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCAGCAGAT
GCGAGACAGTGGTCACACAGTCTCCCGCCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAAAGAGCCAC
ACTGAGCTGTAGAGCCAGCACCAGCGTGATCACACTGCTGCACTGGTTCCAGCAGAAGCCTG
GACAGGCTCCCAGACTGCTGATTACGGCGCCAGCAACCTGGAAGCAGAGTGCCTGCCAG
ATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGATTTACCCCTGACCATAAGCAGCCTGGAACCTGAGG
ACTTCGCCACCTACTTTTGGCCAGCAGAGCTGGAACGACCCCTACACCTTTGGCCAGGGCACC
AAGCTGGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA
TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA
GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA
GAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACG
CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

10

20

分泌シグナルペプチドはイタリック体であり、最終の終止コドン（T A G）を含み、定常領域は太字であり、C D R には下線を引く。

【 0 0 4 8 】

一部の実施形態では、抗体は、ヒト C H 1、ヒトヒンジ、ヒト C H 2 及びヒト C H 3 ドメインを含むヒト重鎖定常領域を含む。一部の実施形態では、コードされる重鎖定常領域は、F c 部分を含み、この場合、F c 部分は、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 又は I g M アイソタイプである。実施形態では、F c は I g G 1 であり、アロタイプは z n o n a である。実施形態では、軽鎖は、カッパ軽鎖である。

30

【 0 0 4 9 】

一部の実施形態では、抗体は、脱フコシル化されている I g G 1 F c 定常領域を含む。脱フコシル化は、当技術分野において公知の技術により実行し得る。例えば、G D P - マンノース 4 , 6 - デヒドラターゼの欠乏により、例えば、G D P - フコース形成が欠損した細胞株における抗体の産生、フコシルトランスフェラーゼのレベルが低下した細胞における抗体の産生、G D P - フコース輸送体のレベルが低下した細胞における抗体の産生、- 1 , 4 - マンノシル - 糖タンパク質 4 - - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（G n T - I I I）を高発現する細胞における抗体の産生、又は細菌 G D P - 6 - デオキシ - D - リキソ - 4 - ヘキスロースレダクターゼ（R M D）を発現する細胞における抗体の産生が挙げられる。本発明の脱フコシル化抗 C C R 8 抗体の産生に使用する細胞は、シュードモナス R M D を発現するように改変した C H O 細胞である。抗体の脱フコシル化の程度は、当技術分野において公知の技術により定量することができる。典型的には、抗体は、7 0 % 以上、8 0 % 以上、9 0 % 以上又は約 9 9 % 又は約 1 0 0 % 脱フコシル化されている。好ましくは、脱フコシル化の程度は、8 0 % 以上である。一部の実施形態では、抗体は、A S N - 3 0 0（E U : A S N - 2 9 7）の位置において 7 0 % 以上、8 0 % 以上、9 0 % 以上又は約 1 0 0 % 脱フコシル化されている。脱フコシル化は、親水性相互作用クロマトグラフィー（H I L I C）アッセイ技術により定量することができ、この脱フコシル化の程度は、断片化抗体の極性依存的分離により定量する。

40

【 0 0 5 0 】

実施形態では、脱フコシル化グリカン種の総量は、蛍光検出を用いた H I L I C による

50

遊離N連鎖グリカンの分析によって定量する。グリカンは、ペプチドN-グリコシダーゼF (PNGase F) を使用して遊離させた後、蛍光タグで標識する。蛍光標識N連鎖グリカンは、蛍光検出を用いたHILICにより分析する。パーセント脱フコシル化グリカン種は、すべての脱フコシル化グリカンピークのピーク領域の和に基づいて、クロマトグラムにおけるすべてのグリカンピークの全ピーク領域と比較して定量する。0.5%以上の相対存在量によるすべてのピークは、パーセント脱フコシル化グリカン種の定量に含まれる。

【0051】

7.1. 抗CCR8抗体をコードするポリヌクレオチド、発現系及び抗体を作製する方法
本開示は、抗CCR8抗体の免疫グロブリン軽鎖及び重鎖遺伝子をコードするポリヌクレオチド分子、このようなポリヌクレオチドを含むベクター及び本開示の抗CCR8抗体を産生可能な宿主細胞を包含する。

10

【0052】

本開示の抗CCR8抗体は、宿主細胞における免疫グロブリン軽鎖及び重鎖遺伝子の組換え発現により調製することができる。抗体を組換えにより発現させるために、宿主細胞に、抗体の免疫グロブリン軽鎖及び重鎖をコードするDNA断片を保有する1つ以上の組換え発現ベクターをトランスフェクトすることにより、宿主細胞において軽鎖及び重鎖を発現させ、任意選択で、宿主細胞を培養した培地中に分泌させて、この培地から抗体を回収することができる。

【0053】

20

このような抗CCR8抗体をコードするポリヌクレオチドを生成するために、軽鎖及び重鎖可変領域をコードするDNA断片を最初に得る。このようなDNAは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用した、軽鎖及び重鎖可変配列をコードする生殖系列DNA又はcDNAの増幅及び修飾により得ることができる。

【0054】

抗CCR8抗体関連VH及びVLセグメントをコードするDNA断片が得られると、このようなDNA断片を、標準的組換えDNA技術によってさらに操作して、例えば、可変領域遺伝子を完全長抗体鎖遺伝子、Fab断片遺伝子又はscFv遺伝子に変換することができる。このような操作では、VL又はVHコードDNA断片は、別のタンパク質、例えば、抗体定常領域又は可動性リンカーをコードする別のDNA断片に動作可能に連鎖する。「動作可能に連鎖」の用語は、この文脈において使用する場合、DNA断片2つによりコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるようにDNA断片2つを連結することを意味することを意図する。

30

【0055】

VHコードDNAを、重鎖定常領域(CH1、CH2、CH3及び任意選択で、CH4)をコードする別のDNA分子に動作可能に連鎖させることにより、VH領域をコードする単離DNAを、完全長重鎖遺伝子に変換することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野において公知であり(例えば、Kabata, E. A., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照)、このような領域を包含するDNA断片は、標準的PCR増幅により得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM又はIgD定常領域であり得るが、特定の実施形態では、IgG1又はIgG4である。Fab断片重鎖遺伝子では、VHコードDNAは、重鎖CH1定常領域のみをコードする別のDNA分子に動作可能に連鎖し得る。

40

【0056】

VLコードDNAを、軽鎖定常領域CLをコードする別のDNA分子に動作可能に連鎖させることにより、VL領域をコードする単離DNAを、完全長軽鎖遺伝子(並びにFab軽鎖遺伝子)に変換することができる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野

50

において公知であり（例えば、Kabataら、1991、Sequences of Proteins of Immunological Interest、Fifth Edition、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242を参照）、このような領域を包含するDNA断片は、標準的PCR増幅により得ることができる。軽鎖定常領域は、カップ又はラムダ定常領域であり得るが、特定の実施形態では、カップ定常領域である。

【0057】

本開示の抗CCR8抗体を発現させるために、上記のように得られる部分的又は完全長軽鎖及び重鎖をコードするDNAは、発現ベクターに挿入することにより、遺伝子を転写及び翻訳調節配列に動作可能に連鎖させる。この文脈では、「動作可能に連鎖」の用語は、ベクター内の転写及び翻訳調節配列が、これらの意図する、抗体遺伝子の転写及び翻訳を制御する機能に役立つように、抗体遺伝子をベクター内にライゲーションすることを意味することを意図する。発現ベクター及び発現調節配列は、使用する発現宿主細胞と適合するように選択する。抗体軽鎖遺伝子及び抗体重鎖遺伝子は、別々のベクターに挿入することができ、又はより典型的には、両遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入する。

【0058】

抗体遺伝子は、標準的方法（例えば、抗体遺伝子断片及びベクター上の相補性制限部位のライゲーション、又は制限部位が存在しない場合、平滑末端ライゲーション）により発現ベクターに挿入する。抗CCR8抗体関連軽鎖又は重鎖配列の挿入前には、発現ベクターは、抗体定常領域配列を既に保有し得る。例えば、抗CCR8モノクローナル抗体関連VH及びVL配列の完全長抗体遺伝子への変換のための一手法は、これらを、重鎖定常及び軽鎖定常領域を既にコードする発現ベクターにそれぞれ挿入することにより、VHセグメントを、ベクター内のCHセグメント（複数可）に動作可能に連鎖させ、VLセグメントを、ベクター内のCLセグメントに動作可能に連鎖させることである。加えて又は代替的に、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を容易とするシグナルペプチドをコードし得る。抗体鎖遺伝子をベクター内にクローニングすることにより、シグナルペプチドを抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連鎖し得る。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチド又は異種シグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）であり得る。

【0059】

抗体鎖遺伝子に加えて、本開示の組換え発現ベクターは、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を調節する制御配列を保有する。「制御配列」の用語は、プロモーター、エンハンサー及び抗体鎖遺伝子の転写又は翻訳を調節する他の発現調節エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことを意図する。

【0060】

抗体鎖遺伝子及び制御配列に加えて、本開示の組換え発現ベクターは、宿主細胞におけるベクターの複製を制御する配列（例えば、複製起点）及び選択可能なマーカー遺伝子などのさらなる配列を保有し得る。選択的マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易とする。軽鎖及び重鎖の発現では、重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクター（複数可）は、標準的技術により宿主細胞にトランスフェクトする。「トランスフェクション」の用語の種々の形態は、原核又は真核宿主細胞への外因性DNAの導入に一般に使用される多種多様な技術、例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム沈降、DEAE-デキストラントランスフェクション等を包含することを意図する。

【0061】

原核又は真核のいずれかの宿主細胞において本開示の抗体を発現させることが可能である。特定の実施形態では、抗体の発現は、適切に折り畳まれかつ免疫学的に活性な抗体の分泌に最適な、真核細胞、例えば、哺乳動物宿主細胞において実施する。本開示の組換え抗体を発現させるための哺乳動物宿主細胞の例としては、チャイニーズハムスター卵巣（

10

20

30

40

50

CHO)細胞(例えば、Kaufman and Sharp、1982、Mol. Biol. 159:601~621に記載のDHFR選択可能マーカーとともに使用される、Urlaub and Chasin、1980、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216~4220に記載のDHFR-CHO細胞を含む)、NSO骨髓腫細胞、COS細胞及びSP2細胞が挙げられる。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入する場合、抗体は、宿主細胞における抗体の発現、又は宿主細胞を増殖させる培養培地中への抗体の分泌が可能となるのに十分な期間、宿主細胞を培養することにより産生される。抗体は、標準的タンパク質精製方法を使用して培養培地から回収することができる。また、宿主細胞を使用して、インタクトな抗体の部分、例えば、Fab断片又はscFv分子を産生することができる。上記の手順の変形形態は、本開示の範囲内であることが理解される。例えば、宿主細胞に、本開示の抗CCR8抗体の軽鎖又は重鎖のいずれか(両方ではなく)をコードするDNAをトランスフェクトすることが望まれ得る。

10

【0062】

また、組換えDNA技術を使用して、ヒトCCR8に結合させるのに不必要な軽鎖及び重鎖のいずれか又は両方をコードするDNAの一部又は全部を除去することができる。また、このような切断DNA分子から発現する分子は、本開示の抗体に包含する。

【0063】

本開示の抗CCR8抗体の組換え発現では、宿主細胞は、本開示の発現ベクター2つと同時トランスフェクトすることができ、第1のベクターは、重鎖由来ポリペプチドをコードし、第2のベクターは、軽鎖由来ポリペプチドをコードする。2つのベクターは、同一の選択可能なマーカーを含んでもよく、又はこれらは、別々の選択可能なマーカーを含み得る。代替的に、重鎖及び軽鎖の両ポリペプチドをコードする、単一のベクターを使用することができる。

20

【0064】

抗CCR8抗体の1つ以上の部分をコードするポリヌクレオチドが得られると、さらなる変化又は変異をコード配列に導入して、例えば、種々のCDR配列を有する抗体、Fc受容体に対する親和性が低下した抗体、又は種々のサブクラスの抗体をコードするポリヌクレオチドを生成することができる。

【0065】

また、本開示の抗CCR8抗体は、化学合成により又は無細胞プラットフォームを使用することにより産生することができる。

30

【0066】

7.2. 抗CCR8抗体の精製

本開示のポリペプチドを組換え発現により産生すると、タンパク質の精製のための当技術分野において公知の任意の方法により、これを精製することができる。単離すると、抗CCR8抗体は、さらに精製することができる。

【0067】

7.3. 組成物

本開示の抗体は、対象への投与に適する組成物として提供し得る。一部の実施形態では、抗体組成物は、本開示の抗体及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。

40

【0068】

実施形態では、複数の抗CCR8抗体及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。実施形態では、医薬組成物の複数の抗CCR8抗体は、脱フコシル化されている。典型的には、複数の抗体は、70%以上、80%以上、90%以上又は約99%又は約100%脱フコシル化されている。好ましくは、脱フコシル化の程度は、90%以上である。一部の実施形態では、複数の抗体は、ASN-300(EU:ASN-297)の位置において70%以上、80%以上、90%以上又は約100%脱フコシル化されている。抗体の脱フコシル化の程度は、当技術分野において公知の技術により定量することができる。脱フコシル化は、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)アッセイ技

50

術により定量することができ、この脱フコシル化の程度は、断片化抗体の極性依存的分離により定量する。実施形態では、脱フコシル化グリカン種の総量は、蛍光検出を用いたH I L I Cによる遊離N連鎖グリカンの分析によって定量する。グリカンは、ペプチドN - グリコシダーゼF (P N G a s e F) を使用して遊離させた後、蛍光タグで標識する。蛍光標識N連鎖グリカンは、蛍光検出を用いたH I L I Cにより分析する。パーセント脱フコシル化グリカン種は、すべての脱フコシル化グリカンピークのピーク領域の和に基づいて、クロマトグラムにおけるすべてのグリカンピークの全ピーク領域と比較して定量する。0.5%以上の相対存在量によるすべてのピークは、パーセント脱フコシル化グリカン種の定量に含まれる。

【0069】

10

7.4. 主題の抗体の特性の要約

A B B V - 5 1 4 により例証するが、これに限定されない主題の抗体の特性は、以下を含む。

【0070】

C C R 8 に対する高親和性結合、例えば、T A L L - 1 細胞上に内因的に発現したC C R 8 により定量した場合 (ヒト成人 T - A L L ; R R I D : C V C L 1 7 3 6) 、 F A C S 結合平均 E C ₅₀ が 2 μ g / m L 以下、1 μ g / m L 以下、0.3 ~ 0.7 μ g / m L、0.4 ~ 0.6 μ g / m L、約 0.5 μ g / m L、若しくは 0.55 μ g / m L ; 又はジャーカット細胞上で高発現したヒトC C R 8 に対するF A C S 結合平均 E C ₅₀ が 2 μ g / m L 以下、1 μ g / m L 以下、0.3 ~ 0.8 μ g / m L、0.4 ~ 0.7 μ g / m L、約 0.5 μ g / m L、若しくは 0.6 μ g / m L ; 又はヒト血中C D 4 5 R A 1 o w T r e g 上で発現したC C R 8 に対するF A C S 結合平均 E C ₅₀ が 2 μ g / m L 以下、1 μ g / m L 以下、0.2 ~ 0.6 μ g / m L、0.3 ~ 0.5 μ g / m L、約 0.5 μ g / m L、若しくは 0.48 μ g / m L である。

20

【0071】

ヒトC C R 8 に対する高特異性結合、例えば、T A L L - 1 C C R 8 ノックアウト細胞又は親ジャーカット細胞に対する非特異的F A C S 結合。

【0072】

カニクイザルC C R 8 との交差反応性、例えば、ジャーカット細胞上で高発現したc y n o C C R 8 に対するF A C S 結合平均 E C ₅₀ が 5 μ g / m L 以下、3 μ g / m L 以下、2 μ g / m L 以下、およそ 1.5 μ g / m L、若しくは 1.82 μ g / m L ; 又はc y n o 血中C D 4 5 R A 1 o w T r e g 上で発現したC C R 8 に対するF A C S 結合平均 E C ₅₀ が 5 μ g / m L 以下、3 μ g / m L 以下、2 μ g / m L 以下、およそ 1.5 μ g / m L、若しくは 1.62 μ g / m L である。

30

【0073】

C C L 1 / C C R 8 相互作用を遮断する能力が弱いこと、例えば、C C L 1 / C C R 8 遮断活性における E C ₅₀ が、ヒトC C R 8 に対する結合における E C ₅₀ よりも少なくとも 30 × 高く、少なくとも 40 × 高く、30 × ~ 70 × 高く、少なくとも 50 × 高く、又は少なくとも約 50 × 高い。

【0074】

40

同一の変換領域及び野生型フコシル化 I g G 1 を有する抗体に関するA D C C を誘導する能力の増強。

【0075】

同一の変換領域及び野生型フコシル化 I g G 1 を有する抗体に関するF c 受容体に対する結合の増強。

【0076】

サイトカイン放出アッセイにより定量した免疫安全性が良好であること。

【0077】

7.5. 使用の方法

実施形態では、本明細書に記載の方法は、固形腫瘍を有する患者を本発明の抗C C R 8

50

抗体により治療するステップを含む。実施形態では、抗CCR8抗体を含む組成物は、これを必要とする対象に投与する。

【0078】

PD-1抵抗性Pan02マウスモデルでは、CCR8及びPD-1標的化抗体の組合せにより、いずれかの抗体による単独療法に対してインビボでの有効性の向上が示された。免疫抑制CCR8+Tregの枯渇は、PD-1/PDLリガンド1(PD-L1)遮断と協同して、さらに強力なCD8+エフェクターT細胞応答を促進し、抗腫瘍免疫を増強し得る。実施形態では、抗CCR8抗体を含む組成物は、PD-1又はPD-L1標的化抗体の投与を含む併用療法の一部として投与する。実施形態では、抗CCR8抗体を含む組成物は、ベムプロリズマブ、ブディガリマブ(budigalimab)、ニボルマブ、セミプリマブ又はドスタリマブ(dostarlumab)とともに併用療法として投与する。実施形態では、抗CCR8抗体を含む組成物は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブとともに併用療法として投与する。

10

【実施例】

【0079】

本明細書に記載の抗体及び結合断片の例となる実施形態の特定の特徴及び特性を強調する、以下の実施例は、例示の目的のために提供する。

【0080】

8.1. [実施例1] ラットハイブリドーマの産生

ラットを2つの異なる完全長ヒトCCR8 cDNAベクターにより免疫化した(各ベクターに対してラット6匹)。リンパ節細胞を単離し、NS0に融合させてハイブリドーマを生成した。増殖後、ハイブリドーマ上清を、HEK293細胞上で高発現したヒト又はカニクイザル(cyno又はcy)CCR8への結合についてスクリーニングした。46種のラット/hIgG1キメラmAbが、ハイスループット抗体産生により発現し、21種が、ヒトCCR8に結合することが確認された(図1)。AC-254290、AC-254532、AC-254546及びAC-254259の4つのキメラmAbを、完全ヒト化のために、ジャーカットCCR8高発現株における最も高いcyno交差反応性に基づいて選択した。

20

【0081】

8.2. [実施例2] huCCR8に対する競合結合によるエピトープマッピング

選択したキメラ抗体を、ジャーカット細胞上のヒトCCR8への結合について、BD Biosciences社(クローン433H)及びBiolegend社(クローンL263G8)のヒトCCR8抗体とともに細胞エピトープマッピングアッセイにより検査した。市販の両抗体は、ヒトCCR8トランスフェクタントによるマウスの免疫化により生成されたものとして報告され、いずれもcynoCCR8と交差反応性ではなかった。抗体は、飽和濃度の抗体1で染色した細胞と対で検査、洗浄し、次いで、抗体2で染色し、又はこの逆を行った。

30

【0082】

AC-254290及びAC-254532のmAbは、いずれかの順序で結合に干渉し、これらが同一のエピトープ(エピトープA)に結合することを示唆した(図2)。AC-254546は、AC-254290及びAC-254532と中程度のエピトープ結合干渉を示すが、同一エピトープへの結合の証拠はなく、したがって、AC-254546は、ユニークであるがエピトープAに近い、エピトープBに結合する。AC-254259は、他のいかなる抗体との結合干渉も有せず、ユニークなエピトープであり得る(エピトープC)。BD Biosciences社のクローン433Hは、AC-254290と同一のエピトープ結合を有し、AC-254532、AC-254546及びBiolegend社のクローンL263G8との一部の干渉結合を有し、したがって、エピトープAとビニングされる。BD Biosciences社のクローン433H及び他の抗体による干渉データに基づいて、Biolegend社のクローンL263G8は、ユニークであるがエピトープBではなくエピトープAに近い、エピトープDとしてビニ

40

50

ングされる。

【 0 0 8 3 】

8 . 3 . [実施例 3] ラット可変ドメイン / ヒト I g G 1 F c キメラのヒト化

4 つのキメラ抗体 A C - 2 5 4 2 9 0、A C - 2 5 4 5 3 2、A C - 2 5 4 5 4 6 及び A C - 2 5 4 2 5 9 を、(i) げっ歯類抗体配列を同定し、(i i) C D R 及び抗体フレームワークを同定し、(i i i) V H - V L 構造モデルを作出し、(i v) 復帰変異のフレームワーク残基を同定して、げっ歯類抗体の機能を維持し、(v) 高い同一性を有するヒト生殖系列、最も類似する C D R 正準構造及び必要とされる最小復帰変異を選択し、(v i) C D R 移植及び選択した復帰変異の組み込みにより V H / V L 配列を生成することによりヒト化した。

10

【 0 0 8 4 】

ヒト化抗体 4 つは、選択した各抗体について作出した。A C - 2 5 4 2 9 0 は、配列及び構造の両方に基づくヒト化の手法を必要とした。ストレート C D R 移植により、ヒト C C R 8 発現ジャーカー細胞への結合が弱い抗体が生じた。予想されたげっ歯類 V H / V L 構造 / 界面に基づく復帰変異を検査した。H C D R 3 の前の三つ組の残基は C T A であり、これは非定型であった。9 4 番目 (C T A の A) は、ほとんどの場合、アルギニン (R) である。C T R を有するヒト化バージョン 2 つは、ヒト C C R 8 発現ジャーカー細胞への結合が弱いことを示し、E C ₅₀ は 3 . 9 6 及び 5 . 6 1 μ g / m L であった。対照的に、H C D R 3 の前に C T A を有するヒト化バージョン (C T A G D R N K P F A Y (配列番号 1 4)) 2 つは、このうちの 1 つは A C - 2 6 4 7 0 0 であるが、強力な結合を実証し、E C ₅₀ は 0 . 2 5 5 9 及び 0 . 2 3 0 2 μ g / m L であり、A C - 2 5 4 2 9 0 親抗体に引けを取らないものだった (E C ₅₀ は 0 . 4 5 3 8 μ g / m L) 。

20

【 0 0 8 5 】

ヒト化抗体は、ヒト又はカニクイザル C C R 8 に結合する能力について評価した。E C ₅₀ は、5 × 希釈で 3 0 μ g / m L から開始する 8 つの濃度の抗体を、ヒト又はカニクイザル C C R 8 高発現ジャーカー細胞への結合について検査することにより定量した。C C R 8 検査抗体とのインキュベーション後、細胞を洗浄し、蛍光色素標識二次抗体とともにインキュベート、洗浄して、フローサイトメトリーにより分析した。

【 0 0 8 6 】

A C - 2 5 4 2 5 9 及び A C - 2 5 4 5 3 2 は、c y n o C C R 8 への結合の低下及び H E K 2 9 3 細胞への高い非特異的結合をそれぞれ示した。A C - 2 6 4 7 1 1 (ヒト化 A C - 2 5 4 5 4 6) 及び A C - 2 6 4 7 0 0 (ヒト化 A C - 2 5 4 2 9 0) は、優れた標的結合、非特異的結合の非存在及びライアビリティ改変のための要件が限定的であることにより、進歩的であった。

30

【 0 0 8 7 】

8 . 4 . [実施例 4] A C - 2 6 4 7 0 0 のライアビリティ改変

A C - 2 6 4 7 0 0 は、H C D R 2 及び L C D R 1 のアミノ酸 6 1 ~ 6 2 及び 2 7 ~ 2 8 (k a b a t) において、異性化のリスクである D S モチーフをそれぞれ有し、L C D R 3 のアミノ酸 9 4 ~ 9 5 番目 (k a b a t) において、潜在的に断片化させる D P モチーフを有した。H C D R 2 の D S ライアビリティは、これまでの抗体による経験に基づいて D A に変異させた。D P モチーフの除去によって結合は破壊されたが、D P モチーフを保持する抗体の断片化は、ストレス検査下で現れなかった。L C D R 1 D S バリエーション抗体 2 2 種を作出し、これらの結合特性を、h u C C R 8 又は c y C C R 8 高発現ジャーカー細胞に対してフローサイトメトリーを使用して評価した。ジャーカー細胞への非特異的結合をフローサイトメトリーにより評価した。バリエーション抗体 1 0 種は、好ましい機能及び薬物様特性に基づいて、さらなる特性決定のために選択した。2 つは、結合、自己相互作用の低下、非特異性の欠如、c y n o 交差反応性及び h F c R I I I a V バリエーション A D C C レポーターバイオアッセイ (P r o m e g a 社) における活性を含む、特性の全組合せに基づいて、進歩的利点のために選択した。

40

【 0 0 8 8 】

50

候補分子は、ジャーカット細胞表面上の高発現した h u C C R 8 又は c y C C R 8 に対し、公知の方法によりフローサイトメトリーを使用して、結合能について評価した。例となる抗体は、自己相互作用し、h u C C R 8 及び c y C C R 8 に結合する能力、レポーターバイオアッセイを使用した A D C C の能力、並びに H E K 2 9 3 細胞への非特異的結合について検査した。A C - 2 7 7 3 5 7 は、親及び他の候補抗体と比較した場合、h u C C R 8 及び c y C C R 8 の両ジャーカット細胞について優れた結合能を有した（表 1）。各候補の A C - S I N S 自己相互作用スコアは、< 1 であった。1 0 0 μ g / m L では、非特異的結合最大値は、9 7 ~ 1 4 4 G M F I の範囲に及んだ。1 0 μ g / m L では、非特異的結合最大値は、9 4 ~ 1 1 1 G M F I の範囲に及んだ。1 μ g / m L では、非特異的結合最大値は、8 7 ~ 1 0 2 G M F I の範囲に及んだ。A C - 2 7 7 3 5 7 は、H E K 2 9 3 細胞に対して 1 0 0 μ g / m L において最も低い非特異的結合最大値を有し、h u C C R 8 及び c y C C R 8 ジャーカット細胞への最も強力な結合を有し、A D C C レポーターバイオアッセイにおいて h u C C R 8 及び c y C C R 8 の両ジャーカット細胞による最大倍率のシグナル誘導を有した。加えて、A C - 2 7 7 3 5 7 は、親抗体と比較した場合、最も低い自己相互作用スコアのうちの 1 つを有した。

【 0 0 8 9 】

【表 1】

表 1: AC-264700 バリエーションの比較

抗体	AC#	AC-264700	AC-277357	AC-277371	AC-277483
	変異	DS	D27→T	D27→G	S28→A
Hu/cyCCR8 ジャーカ ットに対 する結合	huCCR8 EC ₅₀ (nM)	2.33	1.51	1.87	2.90
	cyCCR8 EC ₅₀ (nM)	5.27	2.37	4.83	5.93
ADCC レポ ーター hu/cyCCR8 発現ジャ ーカッ ト細胞	huCCR8 EC ₅₀ (nM)	0.12	0.10	0.05	0.07
	最大倍 率誘導	12.8	15.7	12.7	13.6
	cyCCR8 EC ₅₀ (nM)	0.79	0.75	0.57	1.19
	最大倍 率誘導	12.0	12.3	11.7	10.0

【 0 0 9 0 】

8 . 5 . [実施例 5] A C - 2 6 4 7 1 1 のライアビリティ改変

A C - 2 6 4 7 1 1 は、H C D R 2 領域のアミノ酸 6 0 ~ 6 1 (k a b a t) において、脱アミノ化のリスクを呈する N S モチーフを有した。加えて、H C D R 3 の M 1 0 0 c 残基は、ストレス検査中に高レベルの酸化を示した。

【 0 0 9 1 】

ライアビリティを除去する N S 変異を有する A C - 2 6 4 7 1 1 候補バリエーションは、自己相互作用し、H E K 2 9 3 細胞に非特異的に結合し、h u C C R 8 及び c y C C R 8 ジャーカット細胞に結合し、標的としての h u C C R 8 発現ジャーカット細胞により A D C

Cレポーターバイオアッセイにおいてシグナルを誘導する能力について検査した。NSモチーフの除去は、耐容性を示した。NSバリエーション29種を作出し、これらの結合特性を、ジャーカット親細胞及び高発現huCCR8又はcyCCR8ジャーカット細胞に対してフローサイトメトリーを使用して評価した。最良の結合及び薬物様特性プロファイルを有する抗体5つをADCCレポーターバイオアッセイにおいて検査したところ、特性の最良の組合せを有する抗体3つ、AC-275889、AC-275896及びAC-275898は、酸化を防ぐM100c変異のために進歩的であった。

【0092】

M100c変異を有するAC-275889、AC-275896及びAC-275898のバリエーションを生成し、NS変異体として同一のアッセイにおいて検査した。このよ
 うなアッセイのデータを使用して、薬物様特性検査について抗体8つの優先順位をつけた。
 AC-291774及びAC-291790は、それぞれ8.38及び6.75の最も高い自己相互作用AC-SINSスコアを有した。残りの候補は、1.73~2.79の範囲に及ぶ同等のAC-SINSスコアを有した。AC-275896及びAC-275898は、それぞれ1780及び1065GFMIのHEK293細胞に対する最も高い非特異的結合を有した。AC-291790、AC-275889及びAC-275898は、それぞれ335、148及び141の非特異的結合最大値を有した。10及び1µg/mLでは、すべての候補分子は、それぞれ61~67及び57~60の範囲に及ぶ同等の非特異的結合最大値を有した。AC-291774及びAC-291790は、ジャー
 カット親細胞への結合及び疎水性相互作用クロマトグラフィーにより示す場合、AC-
 275889、AC-275896及びAC-275898と比較して、最も低い非特異的結合を有したが、huCCR8及びcyCCR8発現ジャーカット細胞への強力な結合、並びにhuCCR8及びcyCCR8発現両ジャーカット細胞によるADCCレポーターシグナルの同等のEC₅₀及び倍率誘導を維持した(表2)。

【0093】

【表2】

表2. AC-264711 バリエーションのインビトロでのアッセイ

抗体	AC 番号	AC-275889	AC-275896	AC-275898	AC-291774	AC-291790
	変異	N60→A	S61→E	S61→Q	N60→A M106→I	S61→Q M106→I
Hu/cyCCR8 ジャーカッ トに対する 結合	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
ADCC _{huCCR8} 発現ジャー カッ	huCCR8 EC ₅₀ (nM)	0.07	0.15	0.12	0.19	0.23
	最大倍 率誘導	15.6	14.1	17.0	16.8	18.6
	cyCCR8 EC ₅₀ (nM)	0.10	0.41	0.10	0.30	0.30
	最大倍 率誘導	8.7	7.7	10.7	10.8	12.7

10

20

30

40

50

【 0 0 9 4 】

8 . 6 . [実施例 6] 最終候補抗体の選択

AC - 2 7 7 3 5 7、AC - 2 7 7 3 7 1、AC - 2 9 1 7 7 4 及び AC - 2 9 1 7 9 0 を選択して、さらなる薬物様特性及びインビトロでの免疫安全性実験においてさらに評価した。特性決定のための脱フコシル化バリエーションを生成するために、AC - 2 7 7 3 5 7 を発現する細胞にプラスミドをトランスフェクトしてシュードモナス酵素 GDP - 6 - デオキシ - D - リキソ - 4 - ヘキスロースレダクターゼ (RMD) を発現させた。これにより、フコースのデノボ合成において中間体が最終産物に変換され、脱フコシル化 AC - 2 7 7 3 5 7 の産生が生じる。

【 0 0 9 5 】

候補分子を、ジャーカット huCCR8、ジャーカット cyCCR8 及び TALL - 1 結合活性、標的としての TALL - 1 による hPBMC ADCC 活性、標的としての huCCR8 高発現ジャーカット細胞による F158 エフェクター細胞及び標的としての huCCR8 高発現ジャーカット細胞による V158 エフェクター細胞における ADCC 活性について評価した。AC - 2 7 7 3 5 7 (PR - 1 9 2 5 5 1 4 と呼ぶ) は、TALL - 1 細胞上の CCR8 発現の内因的レベルへの結合の向上を示し、脱フコシル化バージョンは、初代細胞 ADCC アッセイにおいてさらに活性であった (データ非表示)。AC - 2 7 7 3 5 7 / PR - 1 9 2 5 5 1 4 は、AC - 2 9 1 7 7 4 (PR - 1 9 2 8 4 4 4 と呼ぶ) よりも強力にヒト Treg 上の CCR8 に結合し、サイトカイン放出アッセイにおいて、より良好なプロファイルを示す (データ非表示)。最良のインビトロでの機能性及びインビトロでの免疫安全性 (INIS) プロファイル、並びに卓越した薬物様特性を有したため、脱フコシル化ヒト IgG1 Fc を有する AC - 2 7 7 3 5 7 / PR - 1 9 2 5 5 1 4 を主要抗体として選択した。

【 0 0 9 6 】

8 . 7 . [実施例 7] 結合及び機能的能力アッセイ

抗体を単一点のフローサイトメトリーによりスクリーニングして、ヒト又はカニクイザル CCR8 を高発現するジャーカット細胞株への結合を評価した。EC₅₀ は、5 × 希釈で 30 µg / mL から開始する 8 つの濃度の抗体を、ジャーカットヒト CCR8、ジャーカット cyCCR8 及び親ジャーカット細胞への結合について、フローサイトメトリーにより検査することによって定量した。検査 CCR8 抗体とのインキュベーション後、細胞を洗浄して蛍光色素標識二次抗体とともにインキュベートし、洗浄してフローサイトメトリーにより分析した。

【 0 0 9 7 】

ヒト Fc RIIIIa V バリエーションコアキット又はヒト Fc RIIIIa F バリエーション細胞増殖モデルを Promega 社から購入し、指示通りに使用した。ヒト若しくはカニクイザル CCR8 を高発現するジャーカット標的細胞株又は親ジャーカット対照細胞を ADCC アッセイ緩衝液中で 1 回洗浄し、ADCC アッセイ緩衝液中 1 mL あたり 6 × 10⁶ 細胞に希釈して、白壁の 96 ウェルアッセイプレート (Costar 社) 内に 1 ウェルあたり 25 µL で播種した。抗体は、ADCC アッセイ緩衝液中 3 × 最終濃度で希釈して、1 ウェルあたり 25 µL を追加した (1 µg / mL ~ 0 . 000064 µg / mL の範囲に及ぶ 1 : 5 倍 7 点希釈を検査した)。エフェクター細胞 (ヒト Fc RIIIIa V158 バリエーション、ヒト Fc RIIIIa F158 バリエーション又はマウス Fc RII V のいずれか、及びホタルルシフェラーゼの発現を駆動する NFAT 応答エレメントを安定に発現する) を解凍し、最終エフェクター対標的比 1 : 2 : 5 で加えた。37 °C、5 % CO₂ で 6 時間のインキュベーション後、BioGlo 試薬 (Promega 社) を指示通りに混合して加え、発光シグナルを測定した。

【 0 0 9 8 】

8 . 8 . [実施例 8] ABBV - 514 の用量応答曲線

AC - 2 7 7 3 5 7 / PR - 1 9 2 5 5 1 4 のフコシル化及び脱フコシル化 (ABBV - 514 と再命名) バージョンを、ヒト又は cyCCR8 を高発現するジャーカット

10

20

30

40

50

細胞株及び内因的レベルのCCR8を発現するTALL-1細胞に結合する細胞について評価した。細胞結合は、上記の類似の方法を使用したフローサイトメトリーにより評価した。加えて、結合を、親ジャーカット(CCR8無発現)及びCCR8ノックアウト(KO)TALL-1対照株について評価した。ABBV-514は、ジャーカット細胞では、高発現したヒト及びcynoの両CCR8への結合を示したが、親ジャーカット又はCCR8 KO TALL-1細胞では示さなかった(図4A)。また、ABBV-514は、フコシル化(WT)AC-277357/PR-1925514と同様に、TALL-1細胞上の内因性CCR8に結合した(図4B)。

【0099】

ヒト(図5A、5B)又はcyno(図5C、5D)CCR8高発現ジャーカット細胞と同時培養したFcRIIIa V158(図5A、5C)又はF158(図5B、5D)アレルバリエントレポーター株のいずれかを使用した、ヒトFcRIIIaレポーター細胞に基づくバイオアッセイにおいて発光誘導により測定した場合、フコシル化WT PR-1925514及びABBV-514の両方は、ADCCを媒介する。無処理同時培養物と比較した発光の倍率変化は、2～5回の独立した実験の平均±SEMとして示す。ABBV-514は、フコシル化WT PR-1925514と比較してADCCレポーターバイオアッセイにより示す場合、ADCC活性の上昇を示した。 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で表す濃度との比較目的では、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体の濃度は、 6.76nM と等しい。

【0100】

8.9.[実施例9]ABBV-514の初代細胞ADCCアッセイデータ

ABBV-514の活性を、TALL-1細胞を標的として及びヒト初代NK細胞をエフェクターとして使用する細胞の細胞傷害性に基づくADCCアッセイにおいて、さらに評価した。NK細胞のドナーソース6つを標的細胞として使用し、TALL-1標的細胞の細胞死を、上記の類似の方法を使用したフローサイトメトリーにより評価した。ABBV-514は、ドナーNK細胞検体6つすべてによるCCR8発現TALL-1細胞のADCCを媒介した(図6)。ヒト全血培養物におけるADCC活性を、上記の適応手順を使用したフローサイトメトリーにより評価した。48時間後、ABBV-514を有するヒト全血の培養物を分析して、CD45+造血細胞の総量におけるCD45RA low Tregの割合を評価した。CD45RA low Tregは、CD45+、CD3+、CD4+、CD25+、CD127 low、Foxp3+、CD45RA low生細胞を含み、これらは、CCR8発現において濃縮されることで知られている。健常ドナー11人のヒト全血細胞データを評価した。各ドナーにおいて、ABBV-514は、CD45+生細胞のCD45RA low Tregの量のパーセンテージが低下した(データ非表示)。

【0101】

8.10.[実施例10]ABBV-514によるCCL1リガンド遮断の評価

CCR8ベータ-アレスチンレポーターアッセイを使用して、ABBV-514が、CCR8とこのリガンドCCL1との相互作用を遮断するかどうかを判定した(図7)。ABBV-514存在下でのCCL1媒介レポーター活性の阻害が、結合又はADCC活性が観察された濃度よりも実質的に高い濃度の抗体のみにおいて観察され、CCL1遮断におけるEC₅₀が $23.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 観察された。

【0102】

例となる実施形態

種々の特定の実施形態を例示及び開示しており、一部を以下に述べるが、本発明(複数可)の趣旨及び範囲から逸脱することなく種々の変更を行うことができることが理解される。

【0103】

1.(i)3つのCDRを含むVH鎖及び(ii)3つのCDRを含むVL鎖を含む、抗CCR8抗体であって、

VH CDR #1が、GFIFSNAYMY(配列番号1)であり、

10

20

30

40

50

VH CDR # 2 が、RIKTKFNNTYATYYADAVKG (配列番号 2) であり、
 VH CDR # 3 が、GDRNKPFA Y (配列番号 3) であり、
 VL CDR # 1 が、RASTSVITLLH (配列番号 4) であり、
 VL CDR # 2 が、GASNLES (配列番号 5) であり、
 VL CDR # 3 が、QQSWNDPYT (配列番号 6) である、抗CCR8 抗体。

2. アミノ酸配列CTAをVH CDR # 3の直前に含み、これによりアミノ酸配列CTAGDRNKPFA Y (配列番号 14) を含む、実施形態 1 に記載の抗CCR8 抗体。

3. 配列番号 7 として記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 8 として記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、実施形態 1 に記載の抗CCR8 抗体。

4. 配列番号 9 として記載されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 10 として記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、実施形態 1 に記載の抗CCR8 抗体。

5. 脱フコシル化されている、実施形態 3 に記載の抗CCR8 抗体。

6. 実施形態 1 に記載の複数の抗CCR8 抗体を含む、組成物。

7. 組成物中の抗CCR8 抗体の 80 % 超が、脱フコシル化されている、実施形態 6 に記載の組成物。

8. IgG である、実施形態 1 に記載の抗CCR8 抗体。

9. Fc 部分を含むヒト重鎖定常領域を含み、前記Fc部分が、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4 又はIgMアイソタイプである、実施形態 1 に記載の抗CCR8 抗体。

10. カッパ軽鎖定常領域を含む、実施形態 9 に記載の抗CCR8 抗体。

11. 重鎖のC末端のリジンが切断されている、実施形態 4 に記載の抗CCR8 抗体。

12. ヒト化抗体である、実施形態 1 に記載の抗CCR8 抗体。

13. 実施形態 6 に記載の組成物を、これを必要とする患者に投与するステップを含む、固形腫瘍を治療する方法。

14. 抗CCR8 抗体をコードするヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドであって、前記抗体が、(i) 3つのCDRを含むVH鎖及び(ii) 3つのCDRを含むVL鎖を含む、

VH CDR # 1 が、GFIFSNVAVMY (配列番号 1) であり、

VH CDR # 2 が、RIKTKFNNTYATYYADAVKG (配列番号 2) であり、

VH CDR # 3 が、GDRNKPFA Y (配列番号 3) であり、

VL CDR # 1 が、RASTSVITLLH (配列番号 4) であり、

VL CDR # 2 が、GASNLES (配列番号 5) であり、

VL CDR # 3 が、QQSWNDPYT (配列番号 6) である、ポリヌクレオチド。

15. 実施形態 14 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

16. 実施形態 15 に記載のベクターをトランスフェクトした、真核宿主細胞。

17. 哺乳動物宿主細胞である、実施形態 16 に記載の真核宿主細胞。

18. (a) 実施形態 15 に記載の真核宿主細胞を培養するステップ及び(b) 抗CCR8 抗体を回収するステップを含む、抗CCR8 抗体を産生する方法。

19. 実施形態 6 に記載の組成物を、これを必要とする患者に投与するステップを含む、固形腫瘍を治療する方法。

20. 次の特性：

(a) カニクイザルCCR8 との交差反応性、

(b) CCL1 / CCR8 相互作用を遮断する能力が弱いこと、

(c) ADC C を誘導する能力の増強、

(d) Fc 受容体に対する結合の増強、及び

(e) サイトカイン放出アッセイにより定量した免疫安全性が良好であること

の1つ以上を有する抗CCR8 抗体。

21. 次の特性：

(a) カニクイザルCCR8 との交差反応性、

(b) CCL1 / CCR8 相互作用を遮断する能力が弱いこと、

10

20

30

40

50

(c) ADCCを誘導する能力の増強、
 (d) Fc 受容体に対する結合の増強、及び
 (e) サイトカイン放出アッセイにより定量した免疫安全性が良好であること
 を有する抗CCR8抗体。

22. 次の特性：

(a) カニクイザルCCR8との交差反応性、
 (b) CCL1/CCR8相互作用を遮断する能力が弱いこと、
 (c) ADCCを誘導する能力の増強
 を有する抗CCR8抗体。

23. (i) 3つのCDRを含むVH鎖及び(ii) 3つのCDRを含むVL鎖を含む、
 実施形態19～21のいずれか一項に記載の抗CCR8抗体であって、

VH CDR#1が、GFIFSNVAVMY(配列番号1)であり、
 VH CDR#2が、RIKTKFNNTATYYADAVKG(配列番号2)であり、
 VH CDR#3が、GDRNKPFA Y(配列番号3)であり、
 VL CDR#1が、RASTSVITLLH(配列番号4)であり、
 VL CDR#2が、GASNLES(配列番号5)であり、
 VL CDR#3が、QQSWNDPYT(配列番号6)である、抗CCR8抗体。

24. 配列番号7として記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号8として記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、実施形態20～22のいずれか一項に記載の抗CCR8抗体。

25. 配列番号9として記載されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号10として記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、実施形態20～22のいずれか一項に記載の抗CCR8抗体。

26. 脱フコシル化されている、実施形態20～22のいずれか一項に記載の抗CCR8抗体。

27. (i) 3つのCDRを含むVH鎖及び(ii) 3つのCDRを含むVL鎖を含む、
 実施形態20～22のいずれか一項に記載の抗CCR8抗体であって、

VH CDR#1が、GFIFSNVAVMY(配列番号1)であり、
 VH CDR#2が、RIKTKFNNTATYYADAVKG(配列番号2)であり、
 VH CDR#3が、GDRNKPFA Y(配列番号3)であり、
 VL CDR#1が、RASTSVITLLH(配列番号4)であり、
 VL CDR#2が、GASNLES(配列番号5)であり、
 VL CDR#3が、QQSWNDPYT(配列番号6)であり、

前記抗体が、脱フコシル化されている、抗CCR8抗体。

28. 実施形態6に記載の組成物及び抗PD-1抗体を含む組成物の組合せを、これを必要とする患者に投与するステップを含む、固形腫瘍を治療する方法。

29. 抗PD-1抗体が、ブディガリマブ、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ及びドスタリマブからなる群から選択される、実施形態28に記載の方法。

30. 抗PD-1抗体が、ブディガリマブである、実施形態29に記載の方法。

31. 抗PD-1抗体が、ペムブロリズマブである、実施形態29に記載の方法。

32. 実施形態6に記載の組成物及び抗PD-L1抗体を含む組成物の組合せを、これを必要とする患者に投与するステップを含む、固形腫瘍を治療する方法。

33. 抗PD-L1抗体が、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブからなる群から選択される、実施形態32に記載の方法。

34. 抗PD-L1抗体が、アテゾリズマブである、実施形態33に記載の方法。

35. 組成物中の抗CCR8抗体の約70%以上、約80%以上、約90%以上又は約100%以上が、脱フコシル化されている、実施形態6に記載の組成物。

36. 脱フコシル化されている、実施形態2～4のいずれか一項に記載の抗CCR8抗体。

37. 実施形態36に記載の複数の抗CCR8抗体を含む、組成物。

38. 組成物中の抗CCR8抗体の約70%以上、約80%以上、約90%以上又は約1

10

20

30

40

50

00%以上が、脱フコシル化されている、実施形態37に記載の組成物。

39. それぞれが、配列番号9として記載されるアミノ酸配列を含む2つの重鎖、及びそれぞれが、配列番号10として記載されるアミノ酸配列を含む2つの軽鎖を含む、抗CCR8抗体であって、脱フコシル化されている、抗CCR8抗体。

40. 実施形態39に記載の複数の抗CCR8抗体を含む、組成物。

41. 組成物中の抗CCR8抗体の約70%以上、約80%以上、約90%以上又は約100%以上が、脱フコシル化されている、実施形態40に記載の組成物。

【図面】

【図1】

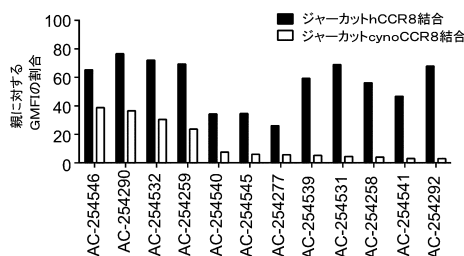


FIG. 1

【図2】

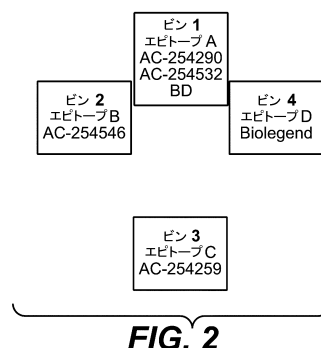


FIG. 2

【図3】

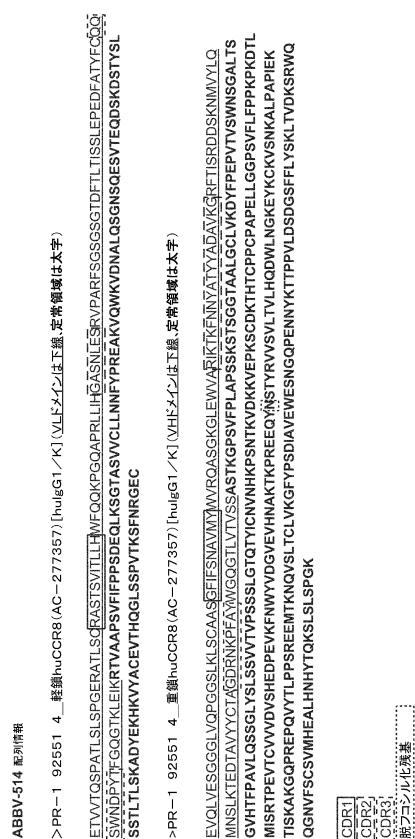


FIG. 3

【図4A】

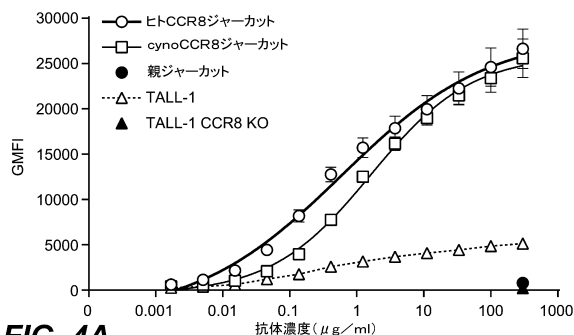


FIG. 4A

10

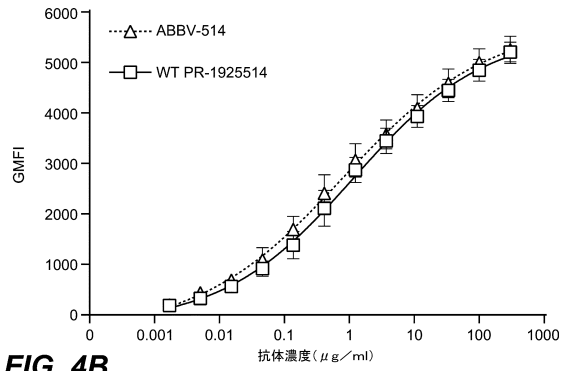
20

30

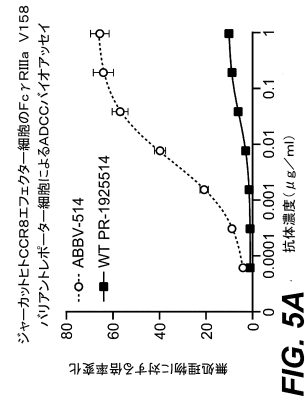
40

50

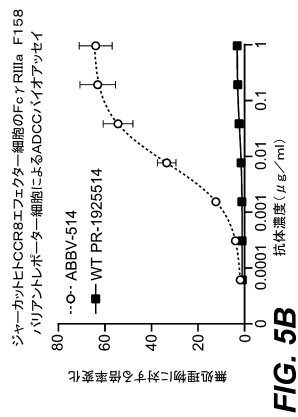
【図 4 B】



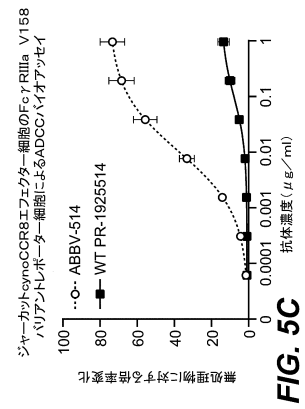
【図 5 A】



【図 5 B】



【図 5 C】



10

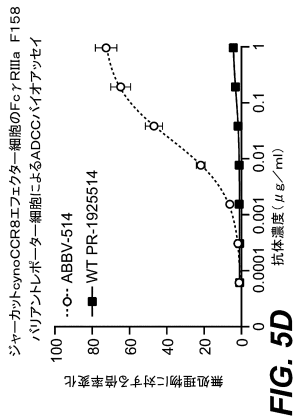
20

30

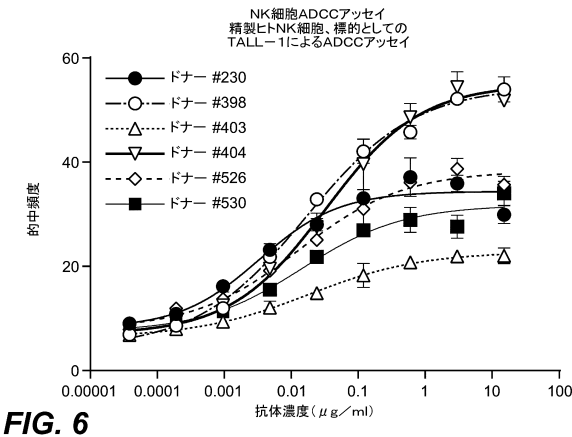
40

50

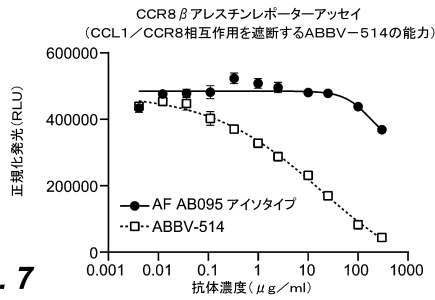
【 図 5 D 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配列表 】

0007638935000001.xml

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

バス・ドライブ・ 1 0

(72)発明者 ジェーン・シーガル

アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 2 1 2 8、サン・ディエゴ、ブライアーリーフ・ウェイ・ 1
1 9 2 6

(72)発明者 アンドリュー・ジェイ・マクラスキー

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・ 0 1 5 2 0、ホールデン、パトリオット・ウェイ・ 2 7

審査官 松原 寛子

(56)参考文献

国際公開第 2 0 2 1 / 1 4 2 0 0 2 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 2 0 / 1 3 8 4 8 9 (W O , A 1)

欧州特許出願公開第 0 3 4 3 1 1 0 5 (E P , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 6 / 2 8

C 1 2 N 1 5 / 6 3

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 P 2 1 / 0 8

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

S w i s s P r o t / G e n e S e q