

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390905** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.08.10

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.10.11

(54) **МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ССР8 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) PCT/CN2020/121494

(72) Изобретатель:

(32) 2020.10.16

Ли Жуньшэн, Хуан Вэньтао (CN)

(33) CN

(74) Представитель:

(86) PCT/CN2021/122994

Нилова М.И. (RU)

(87) WO 2022/078277 2022.04.21

(71) Заявитель:

ЛАНОВА МЕДИСИНС ЛИМИТЕД
(CN)

(57) Предложены антитела или их фрагменты, обладающие специфичностью связывания с белком хемокинового (мотив С-С) рецептора 8 (CCR8) человека. Эти антитела способны связываться с ССР8 с высокой аффинностью и могут опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ).

202390905
A1

202390905

A1

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К CCR8 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0001] Хемокиновый (мотив С-С) рецептор 8 (CCR8) является членом семейства бета-хемокиновых рецепторов и представляет собой семь трансмембранных белков, похожих на рецепторы, сопряженные с G-белками. Хемокины и их рецепторы важны для миграции различных типов клеток в места воспаления. Этот рецепторный белок преимущественно экспрессируется в тимусе. Лиганд CCR8 представляет собой CCL1. CCL8 также выполняет функцию агониста CCR8.

[0002] CCR8 экспрессируется главным образом на регуляторных Т-клетках (Treg) и важен для CCR8⁺ Treg-опосредованной иммуносупрессии. Недавние исследования показали, что уровень экспрессии CCR8 уникальным образом повышен в опухоле-резидентных Treg человека у пациентов с раком. Также было продемонстрировано, что у больных раком популяция CCR8⁺ миелоидных клеток была увеличена.

[0003] Было показано, что антитела, нацеленные на CCR8, значительно подавляют рост опухоли и улучшают долгосрочную выживаемость у модельных животных. Эта противоопухолевая активность коррелировала с увеличением популяции опухолеспецифических Т-клеток и усилением инфильтрации CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Лечение антителами предотвращало индукцию и супрессорную функцию Treg, не влияя на CD8⁺ Т-клетки. Таким образом, нацеливание на CCR8 является перспективным подходом к иммунотерапии рака.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В настоящей заявке предложены антитела к CCR8, которые обладают высокой аффинностью связывания с белком CCR8 человека и эффективны в опосредовании антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ).

[0005] В одном варианте реализации предложены антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с белком хемокинового (мотив С-С) рецептора 8 (CCR8) человека. Антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи,

содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3. В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 28, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

[0006] В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 28, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

[0007] Также в некоторых вариантах реализации предложены композиции, содержащие указанные антитело или его фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации композиция дополнительно содержит второе антитело, обладающее специфичностью к опухолевому антигену. В некоторых вариантах реализации указанное второе антитело представляет собой опухоль-опсонизирующее антитело.

[0008] Также предложены способы и применения для лечения заболеваний и состояний. В одном варианте реализации предложен способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту антитела или его фрагмента согласно настоящему изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0009] На **ФИГ. 1** показана аффинность связывания CCR8 химерных антител с мышинными VH/VL.

[0010] На **ФИГ. 2** показана активность АЗКЦ трех химерных антител.

[0011] На **ФИГ. 3** показано, что гуманизированные антитела 88D2C6 обладают высокими аффинностями.

[0012] На **ФИГ. 4** показано, что гуманизированные антитела 137D1H10 обладают высокими аффинностями.

[0013] На **ФИГ. 5** показано, что по сравнению с химерными антителами гуманизированные антитела обладают значительно более высокими активностями АЗКЦ.

[0014] На **ФИГ. 6** показаны результаты клеточного связывания LM-108 и эталонного антитела с CCR8 человека, полученные методом проточной цитометрии. Верхняя панель: FACS-связывание LM-108 на HEK293, экспрессирующих CCR8 человека. Нижняя панель: FACS-связывание LM-108 на клетках HEK293.

[0015] На **ФИГ. 7** показано клеточное связывание LM-108 с клетками U2OS с высоким уровнем экспрессии CCR8 человека при измерении методом проточной цитометрии.

[0016] На **ФИГ. 8** показано клеточное связывание LM-108 с клетками Jurkat с низким уровнем экспрессии CCR8 человека при измерении методом проточной цитометрии.

[0017] На **ФИГ. 9** показаны результаты репортерного генного анализа АЗКЦ LM-108 с клетками Jurkat/CD16a(158v)/NFAT-luc с клетками U2OS с высоким уровнем экспрессии CCR8 в качестве мишени.

[0018] На **ФИГ. 10** показаны результаты репортерного генного анализа АЗКЦ LM-108 с клетками Jurkat/CD16a(158v)/NFAT с клетками Jurkat с низким уровнем экспрессии CCR8 в качестве мишени.

[0019] На **ФИГ. 11** показаны результаты тестирования АЗКЦ LM-108 с hPBMС с CCR8-экспрессирующими клетками (верхняя панель) или контрольными клетками (нижняя панель) в качестве мишени.

[0020] На **ФИГ. 12** показан АЗКФ LM-108 с макрофагами моноцитарного происхождения при измерении методом FACS. Верхняя панель: АЗКФ LM-108 LM-108 в отношении клеток CHO-K1, сверхэкспрессирующих CCR8 человека. Нижняя панель: АЗКФ LM-108 LM-108 в отношении контрольных клеток CHO-K1.

[0021] На **ФИГ. 13** представлены результаты визуализации АЗКФ LM-108 с макрофагами моноцитарного происхождения при измерении с помощью Operetta.

[0022] На **ФИГ. 14** показаны кривые роста опухоли у мышей с опухолями CT26 после введения LM-108m и антитела к mPD-1 в исследовании эффективности LM-108m *in vivo* на сингенной модели CT26 на мышах BALB/c.

[0023] На **ФИГ. 15** показаны кривые роста опухоли у мышей с опухолями MC38 после введения LM-108m и носителя в исследовании эффективности LM-108 *in vivo* на сингенной модели MC38 на мышах hCCR8 ki.

[0024] На **ФИГ. 16** показаны результаты оценки цитотоксичности LM-108-vc-MMAE на клетках, экспрессирующих hCCR8.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[0025] Следует отметить, что термин в единственном числе относится к одному или более выраженным таким термином объектам; например, под «антителом» подразумевается одно или более антител. Соответственно, термины в единственном числе, «один или более» и «по меньшей мере один» в настоящей заявке могут использоваться взаимозаменяемо.

[0026] В контексте настоящей заявки подразумевается, что термин «полипептид» охватывает «полипептид» в единственном числе, а также множество «полипептидов», и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин «полипептид» относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот, и не относится к определенной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, «белок», «аминокислотная цепь» или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, охватываются определением «полипептид», и термин «полипептид» может использоваться вместо любого из этих терминов или взаимозаменяемо с ним. Также подразумевается, что термин «полипептид» относится к продуктам постэкспрессионных модификаций полипептида, в том числе, не ограничиваясь

перечисленным, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолиза или модификации аминокислотами не природного происхождения. Полипептид может происходить из естественного биологического источника или быть получен с помощью рекомбинантной технологии, однако он не обязательно транслирован с заданной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, в том числе путем химического синтеза.

[0027] «Гомология», или «идентичность», или «сходство» относится к сходству последовательностей двух пептидов или двух молекул нуклеиновой кислоты. Гомология может быть определена путем сравнения положения в каждой последовательности, которые для целей сравнения могут быть выравнены. Когда положение в сравниваемой последовательности занято тем же основанием или аминокислотой, молекулы в этом положении гомологичны. Степень гомологии последовательностей зависит от количества совпадающих или гомологичных положений, общих для последовательностей. «Неродственная» или «негомологичная» последовательность идентична менее чем на 40%, предпочтительно менее чем на 25%, одной из последовательностей согласно настоящему изобретению.

[0028] Если полинуклеотид или полинуклеотидная область (или полипептид или полипептидная область) имеет определенный процент (например, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) «идентичности последовательностей» с другой последовательностью, это означает, что при выравнивании последовательностей этот процент оснований (или аминокислот) при сравнении двух последовательностей является одинаковым.

[0029] Термин «эквивалентная нуклеиновая кислота или полинуклеотид» относится к нуклеиновой кислоте, имеющей нуклеотидную последовательность с некоторой степенью гомологии или идентичности нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты или ее комплемента. Подразумевается, что гомолог двухцепочечной нуклеиновой кислоты включает нуклеиновые кислоты с нуклеотидной последовательностью, которая в некоторой степени гомологична ей или ее комплементу. В одном аспекте гомологи нуклеиновых кислот способны гибридизоваться с нуклеиновой кислотой или ее комплементом. Аналогичным образом «эквивалентный полипептид» относится к полипептиду с некоторой степенью

гомологии или идентичности аминокислотной последовательности референсного полипептида. В некоторых аспектах идентичность последовательностей составляет по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%. В некоторых аспектах эквивалентный полипептид или полинуклеотид содержит одну, две, три, четыре или пять вставок, делеций, замен и их комбинаций по сравнению с референсным полипептидом или полинуклеотидом. В некоторых аспектах эквивалентная последовательность сохраняет активность (например, связывание с эпитопом) или структуру (например, солевой мостик) референсной последовательности.

[0030] В контексте настоящей заявки «антитело» или «антигенсвязывающий полипептид» относится к полипептиду или полипептидному комплексу, который специфичным образом распознает антиген и связывается с ним. Антитело может представлять собой целое антитело и любой его антигенсвязывающий фрагмент или одну его цепь. Таким образом, термин «антитело» включает любую молекулу, содержащую белок или пептид, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, обладающую биологической активностью связывания с антигеном. Их примеры включают, не ограничиваясь перечисленным, определяющий комплементарность участок (CDR) тяжелой или легкой цепи или его лиганд-связывающую часть, вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасный (FR) участок, или любую их часть, или по меньшей мере одну часть связывающего белка.

[0031] Термины «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» в контексте настоящей заявки представляют собой часть антитела, такую как $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ и тому подобное. Независимо от структуры фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным антителом. Термин «фрагмент антитела» включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин «фрагмент антитела» также включает любой синтетический или генетически модифицированный белок, действующий как антитело, связываясь с определенным антигеном с образованием комплекса.

[0032] «Одноцепочечный вариабельный фрагмент» или « $scFv$ » относится к слитому белку вариабельных областей тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей иммуноглобулинов. В некоторых аспектах области соединены коротким линкерным пептидом длиной от 10

до приблизительно 25 аминокислот. Линкер может иметь высокое содержание глицина для гибкости, а также серина или треонина для растворимости, и может либо соединять N-конец V_H с C-концом V_L , либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. Молекулы scFv известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 5,892,019.

[0033] Термин «антитело» охватывает различные широкие классы полипептидов, которые являются биохимически различимыми. Специалистам в данной области техники известно, что тяжелые цепи подразделяют на гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ , ϵ), среди которых также есть несколько подклассов (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Именно природа этой цепи определяет «класс» антитела как IgG, IgM, IgA, IgE или IgG, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgG₅ и т. д., хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов легко различимы специалистом в данной области техники с учетом настоящего описания и, соответственно, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов со всей ясностью находятся в пределах объема настоящего изобретения, при этом последующее обсуждение будет большей частью касаться класса IgG молекул иммуноглобулинов. Что касается IgG, стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи молекулярной массой приблизительно 23000 дальтон и два идентичных полипептида тяжелой цепи молекулярной массой 53000-70000. Эти четыре цепи, как правило, соединены дисульфидными связями в конфигурацию «Y», где легкие цепи включают в себе тяжелые цепи, начинающиеся в устье «Y» и продолжающиеся через переменную область.

[0034] Антитела, антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, поликлональные, моноклональные, мультиспецифичные, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, дисульфид-связанные Fv (sdFv), фрагменты, содержащие домен VK или VH, фрагменты, полученные с помощью

экспрессионной библиотеки Fab-фрагментов, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id-антитела к антителам LIGHT, раскрытым в настоящей заявке). Молекулы иммуноглобулинов или антител согласно настоящему изобретению могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

[0035] Легкие цепи подразделяют на каппа или лямбда (K , λ). Каждый класс тяжелой цепи может быть связан с легкой каппа- или лямбда-цепью. Как правило, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а «хвостовые» части двух тяжелых цепей связываются друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда молекулы иммуноглобулинов вырабатываются гибридомами, В-клетками или генетически модифицированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности проходят от N-конца на раздвоенных концах Y-образной конфигурации до C-конца в нижней части каждой цепи.

[0036] Как легкие, так и тяжелые цепи делятся на области структурной и функциональной гомологии. Термины «константный» и «вариабельный» используются в отношении функции. В этой связи следует понимать, что вариабельные домены частей как легкой (VK), так и тяжелой (VH) цепей определяют распознавание антигена и специфичность. Напротив, константные домены легкой цепи (СК) и тяжелой цепи (СН1, СН2 или СН3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарный перенос, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и тому подобное. Принято, что номера доменов константной области возрастают при удалении от антигенсвязывающего сайта или аминоконца антитела. N-концевая часть является вариабельной областью, а C-концевая часть является константной областью; домены СН3 и СК фактически содержат карбоксиконец тяжелой и легкой цепей, соответственно.

[0037] Как указано выше, вариабельная область позволяет антителу селективно распознавать и специфичным образом связывать эпитопы на антигенах. То есть, домен VK и домен VH, или подмножество определяющих комплементарность участков (CDR) антитела объединяются, образуя вариабельную область, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более

конкретно, антигенсвязывающий сайт определяется тремя CDR на каждой из VH- и VK-цепей (т. е. CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях, например, в определенных молекулах иммуноглобулинов, происходящих из верблюдовых или полученных на основе иммуноглобулинов верблюдовых с помощью генетической модификации, полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей без легких цепей. См., например, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993).

[0038] Во встречающихся в природе антителах шесть «определяющих комплементарность участков» или «CDR», присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, расположенные особым образом, образуя антигенсвязывающий домен при принятии антителом его трехмерной конфигурации в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые «каркасными» участками, демонстрируют меньшую межмолекулярную вариабельность. Каркасные участки в основном принимают конформацию β -листа, а CDR образуют петли, которые соединяют, а в некоторых случаях являются частью структуры β -листа. Таким образом, каркасные участки формируют каркас, который обеспечивает расположение CDR в правильной ориентации посредством межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный занявшими свои положения CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с распознанным эпитопом. Аминокислоты, составляющие CDR и каркасные участки, соответственно, могут быть легко установлены для любой отдельно взятой вариабельной области тяжелой или легкой цепи специалистом в данной области техники, поскольку они были точно определены (см. «Sequences of Proteins of Immunological Interest», Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, *J.Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)).

[0039] В случае, когда существует два или более определений термина, который используется и/или принят в данной области техники, подразумевается, что определение термина, используемое в настоящей заявке, включает все такие значения, если явно не указано иное. Конкретным примером является использование термина

«определяющий комплементарность участок» («CDR») для описания несмежных сайтов связывания антигена, находящихся внутри варибельной области обоих полипептидов тяжелой и легкой цепи. Данный конкретный участок была описан в Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequences of Proteins of Immunological Interest» (1983), и в Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), содержания которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Определения CDR согласно Kabat и Chothia включают перекрывающиеся или подгруппы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, подразумевается, что использование любого из определений в контексте CDR антитела или его вариантов находится в рамках этого термина, как определено и используется в настоящей заявке. Сравнение соответствующих аминокислотных остатков, включающих CDR, как определено в каждом из приведенных выше источников, приведено в таблице ниже. Точные номера остатков, включающих конкретный CDR, будут варьировать в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут рутинным образом определять, какие остатки образуют конкретный CDR, при известной аминокислотной последовательности варибельной области антитела.

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

[0040] Kabat *et al.* также определили систему нумерации для последовательностей варибельных доменов, которая применима к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначным образом применить эту систему «нумерации по Kabat» к любой последовательности варибельного домена, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо самой последовательности. В контексте настоящей заявки термин «система нумерации по Kabat» относится к системе нумерации, сформулированной Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequence of Proteins of Immunological Interest» (1983).

[0041] В дополнение к вышеприведенной таблице система нумерации по Kabat описывает участки CDR следующим образом: CDR-H1 начинается приблизительно с 31 аминокислоты (т. е., приблизительно через 9 остатков после первого остатка

цистеина), включает приблизительно 5-7 аминокислот и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-H2 начинается с пятнадцатого остатка после окончания CDR-H1, включает приблизительно 16-19 аминокислот и заканчивается на следующем остатке аргинина или лизина. CDR-H3 начинается приблизительно с тридцать третьего аминокислотного остатка после окончания CDR-H2; включает 3-25 аминокислот; и заканчивается на последовательности W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту. CDR-L1 начинается приблизительно с 24 остатка (т. е., после остатка цистеина); включает приблизительно 10-17 остатков; и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-L2 начинается приблизительно с шестнадцатого остатка после окончания CDR-L1 и включает приблизительно 7 остатков. CDR-L3 начинается приблизительно с тридцать третьего остатка после окончания CDR-L2 (т. е., после остатка цистеина); включает приблизительно 7-11 остатков и заканчивается на последовательности F или W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту.

[0042] Антитела, раскрытые в настоящей заявке, могут иметь происхождение от любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. В еще одном варианте реализации переменная область может иметь происхождение от хрящевых рыб (например, от акул).

[0043] В контексте настоящей заявки термин «константная область тяжелой цепи» включает аминокислотные последовательности, происходящие из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере одно из следующего: домен СН1, шарнирный (например, верхняя, средняя и/или нижняя шарнирная область) домен, домен СН2, домен СН3 или их вариант или фрагмент. Например, антигенсвязывающий полипептид для использования в изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую домен СН1; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН2; полипептидную цепь, содержащую домен СН1 и домен СН3; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН3, или полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен СН2 и домен СН3. В еще одном варианте реализации полипептид согласно изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую домен СН3. Кроме того, антитело для использования в изобретении

может не иметь по меньшей мере части домена CH2 (например, всего или части домена CH2). Как указано выше, специалисту в данной области техники будет ясно, что константная область тяжелой цепи может быть модифицирована таким образом, что ее аминокислотная последовательность будет отличаться от встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина.

[0044] Константная область тяжелой цепи антитела, раскрытого в настоящей заявке, может происходить из разных молекул иммуноглобулина. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать домен CH1, происходящий из молекулы IgG₁, и шарнирную область, происходящую из молекулы IgG₃. В еще одном примере константная область тяжелой цепи может содержать шарнирную область, происходящую частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₃. В еще одном примере часть тяжелой цепи может содержать химерный шарнир, происходящий частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₄.

[0045] В контексте настоящей заявки термин «константная область легкой цепи» включает аминокислотные последовательности, происходящие из легкой цепи антитела. Предпочтительно константная область легкой цепи содержит по меньшей мере один из константного каппа-домена или константного лямбда-домена.

[0046] «Пара легкой и тяжелой цепей» относится к объединению легкой цепи и тяжелой цепи, которые могут образовывать димер посредством дисульфидной связи между доменом CL легкой цепи и доменом CH1 тяжелой цепи.

[0047] Как отмечено ранее, структуры субъединиц и трехмерная конфигурация константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. В контексте настоящей заявки термин «домен VH» включает аминоконцевой переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, а термин «домен CH1» включает первый (наиболее аминоконцевой) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен CH1 прилегает к домену VH и является аминоконцевым относительно шарнирной области молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина.

[0048] В контексте настоящей заявки термин «домен CH2» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, с приблизительно 244 остатка до 360 остатка антитела, как указано с помощью традиционных схем нумерации (остатки 244-360, система нумерации по Kabat, и остатки 231-340, система нумерации EU, см. Kabat

et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequences of Proteins of Immunological Interest» (1983)). Домен CH2 уникален тем, что он не связан тесно с другим доменом. Скорее, две N-связанные разветвленные углеводные цепи расположены между двумя доменами CH2 интактной нативной молекулы IgG. Также хорошо описано, что домен CH3 лежит от домена CH2 до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

[0049] В контексте настоящей заявки термин «шарнирная область» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH1 с доменом CH2. Эта шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям перемещаться независимо друг от друга. Шарнирные области можно подразделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux *et al.*, *J.Immunol* 161:4083 (1998)).

[0050] В контексте настоящей заявки термин «дисульфидная связь» включает ковалентную связь, образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй тиольной группой. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG области CH1 и СК связаны дисульфидной связью и две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 с использованием системы нумерации по Kabat (положение 226 или 229, система нумерации EU).

[0051] В контексте настоящей заявки за термином «химерное антитело» закреплено значение любого антитела, в котором иммунореактивная область или сайт получены или происходят из первого вида, а константная область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) получена из второго вида. В отдельных вариантах реализации мишень-связывающая область или сайт будут получены из источника, отличного от человека (например, мыши или примата), а константная область является человеческой.

[0052] В контексте настоящей заявки «процент гуманизации» рассчитывают путем определения количества различий в аминокислотах каркаса (т. е., различий в участках, отличных от CDR) между гуманизированным доменом и доменом зародышевой линии,

вычитания этого количества из общего количества аминокислот, а затем деления этой разности на общее количество аминокислот и умножения на 100.

[0053] Под «специфично связывает» или «обладает специфичностью к» обычно подразумевается, что антитело связывается с эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена, и что связывание подразумевает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно этому определению антитело, как говорят, «специфично связывается» с эпитопом, когда оно связывается с этим эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена вероятнее, чем оно связалось бы со случайным, неродственным эпитопом. Термин «специфичность» используется в настоящей заявке для оценки относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело «А» имеет более высокую специфичность для данного эпитопа, чем антитело «В», или об антителе «А» можно сказать, что оно связывается с эпитопом «С» с более высокой специфичностью, чем его специфичность для родственного эпитопа «D».

[0054] В контексте настоящей заявки термины «лечить» или «лечение» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, где целью является предупреждение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, например, прогрессирования рака. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, не ограничиваясь перечисленным, частичное снятие симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) течение заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности или временное ослабление течения заболевания и ремиссию (частичную или полную), как обнаружимые, так и не обнаружимые. «Лечение» также может означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится. Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают уже имеющих состояние или расстройство, а также тех, кто предрасположен к развитию состояния или расстройства, или тех, у кого состояние или расстройство необходимо предупредить.

[0055] Под «субъектом», или «индивидуумом», или «животным», или «пациентом», или «млекопитающим» подразумевается любой субъект, в частности, млекопитающее, для которого желательны диагностика, прогнозирование или терапия. Субъекты-

млекопитающие включают людей, одомашненных животных, сельскохозяйственных животных и животных зоопарка, животных, принимающих участие в спорте, или домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и так далее.

[0056] В контексте настоящей заявки такие фразы, как «нуждающемуся в лечении пациенту» или «нуждающийся в лечении субъект», включают субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, которые получили бы пользу от введения антитела или композиции согласно настоящему изобретению при применении, например, для обнаружения, для процедуры диагностики и/или для лечения.

Антитела к CCR8

[0057] В настоящем изобретении предложены антитела и фрагменты к CCR8, которые обладают высокой аффинностью к белку CCR8 человека, эффективны в опосредовании АЗКЦ и АЗКФ и продемонстрировали высокую эффективность в качестве ингибитора опухоли *in vivo*. Интересно, что при применении антитела к CCR8 (из WO2020138489) в качестве эталона раскрытые в настоящей заявке антитела не демонстрировали связывания с клетками, не экспрессирующими CCR8, в то время как эталонное антитело связывалось также и с этими контрольными клетками. Таким образом, можно ожидать, что настоящие антитела будут иметь меньше нежелательных побочных действий при клиническом применении. Таким образом, эти антитела являются подходящими агентами для лечения различных заболеваний, характеризующихся сверхэкспрессией CCR8, таких как рак.

[0058] Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, способные связываться с CCR8. Примеры антител включают мышинные антитела, перечисленные в **Таблице 1** (например, 137D1H10, 88D2C6, 89B6F8, 132H8E10, 10F11B2, 40H10F3, 53D6A9, 352H11C11, 362G7D3, 362H10A3, 367D10E7, 370D2C10), а также гуманизированные антитела из **Таблиц 2-3**. Также включены антитела, которые содержат те же CDR, что проиллюстрированы в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации раскрытые антитела и фрагменты включают антитела и фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, что и проиллюстрированные в настоящей заявке, и

антитела и фрагменты, которые конкурируют с раскрытыми в настоящей заявке антителами и фрагментами за связывание с CCR8.

[0059] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены антитело или его фрагмент, включающие переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи с участками CDR, раскрытыми в настоящей заявке, а также их биологические эквиваленты.

[0060] В одном варианте реализации CDR представляют собой CDR 88D2C6 или его гуманизированных аналогов, как показано в **Таблицах 2B и 2D**. В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 28, или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации.

[0061] В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, и CDRL3 содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 27 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации.

[0062] В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 28, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

[0063] Также в некоторых вариантах реализации предложены антитела, которые содержат те же CDR, что и 88D2C6 или его гуманизированные аналоги. В некоторых вариантах реализации раскрытые антитела и фрагменты включают антитела и фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, что и 88D2C6 или его гуманизированные аналоги, и антитела и фрагменты, которые конкурируют с любыми из них за связывание с CCR8.

[0064] В некоторых вариантах реализации переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 (мышинной или химерной) и 29-31 (гуманизированной), или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 (мышинной или химерной) и 29-31 (гуманизированной).

[0065] В некоторых вариантах реализации переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 (мышинной или химерной), 32-34 и 41-43 (гуманизированной), или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 (мышинной или химерной), 32-34 и 41-43 (гуманизированной).

[0066] В некоторых вариантах реализации переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и переменная область легкой цепи содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 32-34 и 41-43. В некоторых вариантах реализации переменная область

тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и переменная область легкой цепи содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 32-34 и 41-43. В некоторых вариантах реализации переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и переменная область легкой цепи содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 32-34 и 41-43. В некоторых вариантах реализации переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.

[0067] В одном варианте реализации CDR представляют собой CDR 137D1H10 или его гуманизованных аналогов, как показано в **Таблицах 3В и 3D**. В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 28, или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации.

[0068] В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или ее вариант, содержащий одну, две или три

делеции, вставки, замены или их комбинации, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации, и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 или ее вариант, содержащий одну, две или три делеции, вставки, замены или их комбинации.

[0069] В одном варианте реализации CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 28, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

[0070] Также в некоторых вариантах реализации предложены антитела, которые содержат те же CDR, что и 137D1H10 или его гуманизированные аналоги. В некоторых вариантах реализации раскрытые антитела и фрагменты включают антитела и фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, что и 137D1H10 или его гуманизированные аналоги, и антитела и фрагменты, которые конкурируют с любыми из них за связывание с CCR8.

[0071] В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 (мышинной или химерной) и 38-40 (гуманизированной), или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 (мышинной или химерной) и 29-31 (гуманизированной).

[0072] В некоторых вариантах реализации вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 (мышинной или химерной), 32-34 и 41-43 (гуманизированной), или пептид, по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 (мышинной или химерной), 32-34 и 41-43 (гуманизированной).

[0073] В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и вариабельная область легкой цепи содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 32-34 и 41-43. В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и вариабельная область легкой цепи содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 32-34 и 41-43. В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и вариабельная область легкой цепи содержит любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 32-34 и 41-43. В некоторых вариантах реализации вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

[0074] Антитела, которые содержали эти участки CDR, будь то мышинные, гуманизированные или химерные, обладали сильной активностью связывания и ингибирования CCR8. Как показано в **Примере 4**, определенные остатки в CDR могут быть модифицированы для сохранения или улучшения свойства или снижения вероятности посттрансляционных модификаций (ПТМ) в них. Такие модифицированные CDR могут называться CDR с созревшей аффинностью или CDR со сниженным риском (например, SEQ ID NO: 25).

[0075] Модифицированные CDR могут включать CDR, которые имеют вставку, делецию и/или замены одной, двух или трех аминокислот. В некоторых вариантах реализации замены могут представлять собой консервативные замены.

[0076] «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой такую замену, при которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь. В данной области техники установлены семейства аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например,

треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, не являющийся необходимым аминокислотный остаток в полипептиде иммуноглобулина предпочтительно заменяют другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В другом варианте реализации цепочку аминокислот можно заменить структурно схожей цепочкой, которая отличается по порядку и/или составу представителей семейства боковых цепей.

[0077] Неограничивающие примеры консервативных аминокислотных замен представлены в таблице ниже, где оценка сходства 0 или выше указывает на консервативную замену между двумя аминокислотами.

Таблица А. Матрица сходства аминокислот

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

Таблица В. Консервативные аминокислотные замены

Для аминокислоты	Замена на
Аланин	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Аргинин	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Аспарагин	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Аспарагиновая кислота	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Цистеин	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Глутамин	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp

Глутаминовая кислота	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Глицин	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
Изолейцин	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лейцин	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Лизин	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Метионин	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенилаланин	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Пролин	D-Pro
Серин	D-Ser, Thr, D-Thr, алло-Thr, L-Cys, D-Cys
Треонин	D-Thr, Ser, D-Ser, алло-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Тирозин	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Валин	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0078] Специалисту в данной области техники также будет ясно, что антитела, раскрытые в настоящей заявке, могут быть модифицированы таким образом, что их аминокислотная последовательность будет отличаться от встречающегося в природе связывающего полипептида, из которого они происходят. Например, полипептидная или аминокислотная последовательность, происходящая из обозначенного белка, может быть схожей, например, иметь определенный процент идентичности исходной последовательности, например, она может быть на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична исходной последовательности.

[0079] В отдельных вариантах реализации антитело содержит аминокислотную последовательность или один или более фрагментов, которые обычно не связаны с антителом. Примеры модификаций более подробно описаны ниже. Например, антитело согласно изобретению может содержать гибкую линкерную последовательность или может быть модифицировано с добавлением функционального фрагмента (например, ПЭГ (полиэтиленгликоля), лекарственного средства, токсина или метки).

[0080] Антитела, их варианты или производные согласно изобретению включают производные, которые были модифицированы, т.е., путем ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу таким образом, что ковалентное присоединение не препятствует связыванию антитела с эпитопом. Например, не ограничиваясь перечисленным, антитела могут быть модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования,

амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолиза, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена известными методами, включая, не ограничиваясь перечисленным, специфичное химическое расщепление, ацелирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Кроме того, антитела могут содержать одну или более неканонических аминокислот.

[0081] В некоторых вариантах реализации антитела могут быть конъюгированы с терапевтическими агентами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического ответа, фармацевтическими агентами или ПЭГ.

[0082] Антитела могут быть конъюгированы или слиты с терапевтическим агентом, который может включать детектируемые метки, такие как радиоактивные метки, иммуномодулятор, гормон, фермент, олигонуклеотид, фотоактивный терапевтический или диагностический агент, цитотоксический агент, который может представлять собой лекарственное средство или токсин, агент, усиливающий контраст ультразвукового изображения, нерадиоактивную метку, их комбинацию и другие подобные агенты, известные в данной области техники.

[0083] Антитела могут быть мечены с возможностью обнаружения путем их связывания с хемилюминесцентным соединением. Присутствие меченого хемилюминесцентным соединением антигенсвязывающего полипептида затем определяют путем обнаружения люминесценции, возникающей в ходе химической реакции. Примерами соединений, особенно подходящих в качестве хемилюминесцентной метки, являются люминол, изолюминол, ароматический сложный эфир акридиния, имидазол, соль акридиния и сложный оксалатный эфир.

[0084] Антитела также могут быть мечены с возможностью обнаружения с использованием металлов, испускающих флуоресцентное излучение, таких как ^{152}Eu или другие металлы семейства лантаноидов. Эти металлы могут быть присоединены к антителу с использованием таких металл-хелатирующих групп, как диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА) или этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА). Методики конъюгирования различных фрагментов с антителами

хорошо известны, см. например, Arnon *et al.*, «Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy», в *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), стр. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, «Antibodies For Drug Delivery», в *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson *et al.*, (eds.), Marcel Dekker, Inc., стр. 623- 53 (1987); Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», в *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), стр. 475-506 (1985); «Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy», в *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), Academic Press стр. 303-16 (1985), и Thorpe *et al.*, «The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates», *Immunol. Rev.* (52:119-58 (1982)).

Бифункциональные молекулы и комбинированные терапии

[0085] CCR8 представляет собой хемокин и опухолевый антиген. В качестве молекулы, нацеленной на опухолевый антиген, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфичные к CCR8, можно комбинировать со вторым антигенсвязывающим фрагментом, специфичным к иммунной клетке, или антигенсвязывающим фрагментом, специфичным к иммунной контрольной точке, с получением комбинированной терапии или биспецифичного антитела.

[0086] В некоторых вариантах реализации иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки, моноцита, макрофага, нейтрофила, дендритной клетки, фагоцита, естественной клетки-киллера, эозинофила, базофила и тучной клетки. Молекулы на иммунной клетке, на которые можно нацелиться, включают, например, CCL1, CD3, CD16, CD19, CD28 и CD64. Другие примеры включают PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3 (также известный как CD223), CD28, CD122, 4-1BB (также известный как CD137), TIM3, OX-40 или OX40L, CD40 или CD40L, LIGHT, ICOS/ICOSL, GITR/GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVМ или BTLA (также известный как CD272), иммуноглобулинподобные рецепторы клеток-киллеров (KIR) и CD47.

[0087] В качестве ингибитора иммунной контрольной точки антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфичные к CCR8, можно комбинировать со вторым антигенсвязывающим фрагментом, специфичным к опухолевому антигену, с

получением биспецифичного антитела. «Опухолевый антиген» представляет собой антигенное вещество, продуцируемое в опухолевых клетках, т.е., оно запускает иммунный ответ у хозяина. Опухолевые антигены пригодны для идентификации опухолевых клеток и являются потенциальными кандидатами для применения для терапии рака. Нормальные белки в организме не антигенны. Некоторые белки, тем не менее, продуцируются или сверхэкспрессируются в процессе онкогенеза и, следовательно, выступают в качестве «чужеродных» для организма. Они могут включать нормальные белки, которые хорошо изолированы от иммунной системы, белки, которые обычно продуцируются в очень малых количествах, белки, которые обычно продуцируются только на некоторых стадиях развития, или белки, структура которых изменена вследствие мутации.

[0088] В данной области техники известно большое количество опухолевых антигенов, и новые опухолевые антигены можно легко обнаружить путем скрининга.

Неограничивающие примеры опухолевых антигенов включают EGFR, Her2, EpCAM, CD20, CD30, CD33, CD47, CD52, CD133, CD73, CEA, gpA33, муцины, TAG-72, CIX, PSMA, связывающий фолат белок, GD2, GD3, GM2, VEGF, VEGFR, интегрин, $\alpha V\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, ERBB2, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP и тенасцин.

[0089] В некоторых аспектах, моновалентная единица специфична к белку, который сверхэкспрессируется на опухолевой клетке по сравнению с соответствующей неопухолевой клеткой. Термин «соответствующая неопухолевая клетка», используемый в настоящей заявке, относится к неопухолевой клетке, которая относится к тому же типу клеток, из которого происходит опухолевая клетка. Следует отметить, что такие белки необязательно отличны от опухолевых антигенов.

Неограничивающие примеры включают раковый эмбриональный антиген (РЭА), который сверхэкспрессируется в большинстве карцином ободочной кишки, прямой кишки, молочной железы, легкого, поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта; рецепторы херегулина (HER-2, *neu* или *c-erbB-2*), которые часто сверхэкспрессируются при раках молочной железы, яичника, ободочной кишки, легкого, предстательной железы и шейки матки; рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), который экспрессируется на высоком уровне в ряде солидных опухолей, включая опухоли молочной железы, головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого и

рак предстательной железы; рецептор асиалогликопротеина; рецептор трансферрина; рецептор ферментного комплекса серпина, который экспрессируется на гепатоцитах; рецептор фактора роста фибробластов (FGFR), который сверхэкспрессируется на клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы; рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), для антиангиогенной генотерапии; рецептор фолата, который селективно сверхэкспрессируется в 90% немутационных карцином яичника; гликокаликс поверхности клетки; углеводные рецепторы; и полимерный рецептор иммуноглобулина, который пригоден для доставки гена в клетки респираторного эпителия и перспективен для лечения заболеваний легкого, таких как кистозный фиброз.

[0090] Также предложен еще один формат биспецифичных антител. В некоторых вариантах реализации каждый из фрагмента к PD-L1 и второго фрагмента независимо выбран из Fab-фрагмента, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) или однодоменного антитела. В некоторых вариантах реализации биспецифичное антитело дополнительно содержит Fc-фрагмент.

[0091] Также предложены бифункциональные молекулы, которые содержат не только антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В качестве молекулы, нацеленной на опухолевый антиген, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфичные к CCR8, такие как описанные здесь, можно комбинировать с иммунным цитокином или лигандом, необязательно посредством пептидного линкера. Связанные иммунные цитокины или лиганды включают, не ограничиваясь перечисленными, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, GM-CSF, TNF- α , CD40L, OX40L, CD27L, CD30L, 4-1BBL, LIGHT и GITRL. У таких бифункциональных молекул эффект блокирования иммунных контрольных точек может комбинироваться с местной иммуномодуляцией в очаге опухоли.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство

[0092] В некоторых вариантах реализации антитела или фрагменты могут быть конъюгированы с терапевтическими агентами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического ответа, фармацевтическими агентами или ПЭГ.

[0093] В одном варианте реализации антитела или фрагменты согласно изобретению ковалентно присоединены к фрагменту лекарственного средства. Фрагмент лекарственного средства может представлять собой группу, реагирующую с местом конъюгации на антителе, или быть модифицирован таким образом, чтобы он включал такую группу. Например, фрагмент лекарственного средства может быть присоединен путем алкилирования (например, по лизинам с эpsilon-аминогруппой или N-концу антител), восстановительного аминирования окисленного углевода, трансэтерификации между гидроксильной и карбоксильной группами, амидирования по аминокруппам или карбоксильным группам и конъюгации с тиолами.

[0094] В некоторых вариантах реализации количество фрагментов лекарственного средства p , конъюгированных на молекулу антитела, составляет в среднем от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах реализации p составляет в среднем от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В других вариантах реализации p составляет в среднем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых вариантах реализации p составляет в среднем от приблизительно 1 до приблизительно 20, от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 2 до приблизительно 10, от приблизительно 2 до приблизительно 9, от приблизительно 1 до приблизительно 8, от приблизительно 1 до приблизительно 7, от приблизительно 1 до приблизительно 6, от приблизительно 1 до приблизительно 5, от приблизительно 1 до приблизительно 4, от приблизительно 1 до приблизительно 3 или от приблизительно 1 до приблизительно 2. В некоторых вариантах реализации p составляет от приблизительно 2 до приблизительно 8, от приблизительно 2 до приблизительно 7, от приблизительно 2 до приблизительно 6, от приблизительно 2 до приблизительно 5, от приблизительно 2 до приблизительно 4 или от приблизительно 2 до приблизительно 3.

[0095] Например, когда химическая активация белка приводит к образованию свободных тиольных групп, белок может быть конъюгирован с сульфгидрильным реакционноспособным агентом. В одном аспекте указанный агент представляет собой агент, который по существу специфичен к свободным тиольным группам. Такие агенты включают, например, малеимид, галогенацетамиды (например, иод-, бром- или хлор-), галогенэфиры (например, иод-, бром- или хлор-), галогенметилкетоны (например, иод-, бром- или хлор-), бензилгалогениды (например, иодид, бромид или хлорид), винилсульфон и пиридилтио.

[0096] Лекарственное средство может быть соединено с антителом или фрагментом с помощью линкера. Подходящие линкеры включают, например, расщепляемые и нерасщепляемые линкеры. Расщепляемый линкер обычно подвержен расщеплению во внутриклеточных условиях. Подходящие расщепляемые линкеры включают, например, пептидный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой, такой как лизосомальная протеаза или эндосомальная протеаза. В иллюстративных вариантах реализации линкер может представлять собой дипептидный линкер, такой как линкер валин-цитруллин (val-cit), фенилаланин-лизин (phe-lys) или линкер малеимидакапроил-валин-цитруллин-п-аминобензилоксикарбонил (mc-Val-Cit-PABA). Еще один линкер представляет собой сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат (smcc). Конъюгация сульфо-smcc происходит через малеимидную группу, которая реагирует с сульфгидрилами (тиолами, —SH), в то время как ее сложный эфир сульфо-NHS реагирует с первичными аминами (которые присутствуют в лизине и на N-конце белка или пептида). Еще один линкер представляет собой малеимидакапроил (mc). Другие подходящие линкеры включают линкеры, гидролизуемые при определенном pH или диапазоне pH, такие как гидразоновый линкер. Дополнительные подходящие расщепляемые линкеры включают дисульфидные линкеры. Линкер может быть ковалентно связан с антителом в такой степени, чтобы для высвобождения лекарственного средства антитело должно было подвергнуться внутриклеточной деградации, например, линкер mc и тому подобные.

[0097] Линкер может содержать группу для связывания с антителом. Например, линкер может включать амино, гидроксильные, карбоксильные или сульфгидрильные реакционноспособные группы (например, малеимид, галогенацетамиды (например, иод-, бром- или хлор-), галогенэфиры (например, иод-, бром- или хлор-), галогенметилкетоны (например, иод-, бром- или хлор-), бензилгалогениды (например, иодид, бромид или хлорид), винилсульфон и пиридилтио).

[0098] В некоторых вариантах реализации фрагмент лекарственного средства представляет собой цитотоксический или цитостатический агент, иммунодепрессант, радиоизотоп, токсин или тому подобное. Конъюгат может применяться для ингибирования размножения опухолевой клетки или раковой клетки, индукции апоптоза в опухоли или раковой клетке или для лечения рака у пациента. Конъюгат может применяться соответственно в различных условиях для лечения рака у

животных. Конъюгат может применяться для доставки лекарственного средства в опухолевую клетку или раковую клетку. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что в некоторых вариантах реализации конъюгат связывается или ассоциирует с раковой клеткой, экспрессирующей клаудин 18.2, и конъюгат и/или лекарственное средство может поглощаться опухолевой клеткой или раковой клеткой посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза.

[0099] Оказавшись внутри клетки, одна или более определенных пептидных последовательностей в конъюгате (например, в линкере) гидролитически расщепляются одной или более протеазами, ассоциированными с опухолевой клеткой или раковой клеткой, что приводит к высвобождению лекарственного средства. Затем высвобождаемое лекарственное средство свободно мигрирует внутри клетки и индуцирует цитотоксическую или цитостатическую, или другую активность. В некоторых вариантах реализации лекарственное средство отщепляется от антитела вне опухолевой клетки или раковой клетки, и лекарственное средство затем проникает в клетку или действует на поверхности клетки.

[0100] Примеры фрагментов лекарственного средства или полезных нагрузок выбраны из группы, состоящей из DM1 (майтанин, N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)- или N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанин), mс-ММAD (6-малеимидокапроил-монометилауристатин-D или N-метил-L-валил-N-[(1S,2R)-2-метокси-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-[(1S)-2-фенил-1-(2-тиазолил)этил]амино]пропил]-1-пирролидинил]-1-[(1S)-1-метилпропил]-4-оксобутил]-N-метил-(9Cl)-L-валинамид), mс-ММАF (малеимидокапроил-монометилауристатин F или N-[6-(2,5-дигидро-2,5-диоксо-1H-пиррол-1-ил)-1-оксогексил]-N-метил-L-валил-L-валил-(3R,4S,5S)-3-метокси-5-метил-4-(метиламино)гептаноил-(α R, β R,2S)- β -метокси- α -метил-2-пирролидинпропаноил-L-фенилаланин) и mс-Val-Cit-РАВА-ММАЕ (6-малеимидокапроил-ValcCit-(p-аминобензилоксикарбонил)-монометилауристатин E или N-[[[4-[[N-[6-(2,5-дигидро-2,5-диоксо-1H-пиррол-1-ил)-1-оксогексил]-L-валил-N5-(аминокарбонил)-L-орнитил]амино]фенил]метокси]карбонил]-N-метил-L-валил-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1R,2S)-2-гидрокси-1-метил-2-фенилэтил]амино]-1-метокси-2-метил-3-оксопропил]-1-пирролидинил]-2-метокси-1-[(1S)-1-метилпропил]-4-оксобутил]-N-метил-L-валинамид). DM1 представляет собой производное ингибитора тубулина мйтанина, тогда как ММAD, ММАЕ и ММАF представляют

собой производные ауристатина. В некоторых вариантах реализации фрагмент лекарственного средства выбран из группы, состоящей из mc-MMAF и mc-Val-Cit-PAVA-MMAE. В некоторых вариантах реализации фрагмент лекарственного средства представляет собой майтанзиноид или ауристин.

[0101] Антитела или фрагменты могут быть конъюгированы или слиты с терапевтическим агентом, который может включать детектируемые метки, такие как радиоактивные метки, иммуномодулятор, гормон, фермент, олигонуклеотид, фотоактивный терапевтический или диагностический агент, цитотоксический агент, который может представлять собой лекарственное средство или токсин, агент, усиливающий контраст ультразвукового изображения, нерадиоактивную метку, их комбинацию и другие подобные агенты, известные в данной области техники.

[0102] Антитела могут быть мечены с возможностью обнаружения путем их связывания с хемилюминесцентным соединением. Присутствие меченого хемилюминесцентным соединением антигенсвязывающего полипептида затем определяют путем обнаружения люминесценции, возникающей в ходе химической реакции. Примерами соединений, особенно подходящих в качестве хемилюминесцентной метки, являются люминол, изолюминол, ароматический сложный эфир акридиния, имидазол, соль акридиния и сложный оксалатный эфир.

[0103] Антитела также могут быть мечены с возможностью обнаружения с использованием металлов, испускающих флуоресцентное излучение, таких как ^{152}Eu или другие металлы семейства лантаноидов. Эти металлы могут быть присоединены к антителу с использованием таких металл-хелатирующих групп, как диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА) или этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА). Методики конъюгирования различных фрагментов с антителами хорошо известны, см. например, Arnon *et al.*, «Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy», в Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), стр. 243-56 (Alan R.Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, «Antibodies For Drug Delivery», в Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.*, (eds.), Marcel Dekker, Inc., стр. 623- 53 (1987); Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», в Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), стр. 475-506 (1985); «Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy», в

Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), Academic Press стр. 303-16 (1985), и Thorpe *et al.*, «The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates», *Immunol. Rev.* (52:119-58 (1982)).

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител

[0104] Настоящее изобретение также относится к выделенным полинуклеотидам или молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела, их варианты или производные согласно изобретению. Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать целые переменные области тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов. Кроме того, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать части переменных областей тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов.

[0105] Способы получения антител хорошо известны в данной области техники и описаны в настоящей заявке. В отдельных вариантах реализации как переменные, так и константные области антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению являются полностью человеческими. Полностью человеческие антитела могут быть получены с использованием методик, описанных в данной области техники и в настоящей заявке. Например, полностью человеческие антитела против определенного антигена могут быть получены путем введения этого антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки таких антител в ответ на стимуляцию антигеном, при этом его эндогенные локусы были дезактивированы. Примеры методик, которые могут быть использованы для получения таких антител, описаны в патентах США №№ 6,150,584, 6,458,592, 6,420,140, полностью включенных посредством ссылки.

Способы лечения

[0106] Как описано в настоящей заявке, антитела, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть использованы в определенных способах лечения и диагностики.

[0107] Настоящее изобретение дополнительно относится к способам терапии на основе антител, включающим введение антител согласно изобретению пациенту, такому как животное, млекопитающее и человек, для лечения одного или более расстройств или состояний, описанных в настоящей заявке. Терапевтические соединения согласно изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, антитела согласно изобретению (включая их варианты и производные, как описано в настоящей заявке) и нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела согласно изобретению (включая их варианты и производные, как описано в настоящей заявке).

[0108] Антитела согласно изобретению также могут применяться для лечения или ингибирования рака. В некоторых вариантах реализации раковые клетки у пациента экспрессируют или сверхэкспрессируют CCR8. Как указано выше, CCR8 может быть сверхэкспрессирован в опухолевых клетках, в частности, в опухолях желудка, поджелудочной железы, пищевода, яичника и легкого. Было показано, что ингибирование CCR8 эффективно для лечения опухолей.

[0109] Соответственно, в некоторых вариантах реализации предложены способы лечения рака у нуждающегося в этом пациента. Способ в одном из вариантов реализации включает введение указанному пациенту эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна из раковых клеток (например, стромальных клеток) у пациента сверхэкспрессирует CCR8.

[0110] Способы клеточной терапии, такие как терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR), также охватываются настоящим изобретением. Можно использовать подходящую клетку, которую приводят в контакт с антителом к CCR8 согласно настоящему изобретению (или, в качестве альтернативы, генетически модифицированную для экспрессии антитела к CCR8 согласно настоящему изобретению). В некоторых вариантах реализации антитело представлено в составе химерного антигенного рецептора (CAR). После такого контакта или генетической модификации клетка затем может быть введена больному раком, нуждающемуся в лечении. Больной раком может иметь рак любого типа из описанных в настоящей заявке. Клетка (например, Т-клетка) может представлять собой, например, опухоль-инфильтрирующий Т-лимфоцит, CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку или их комбинацию, не ограничиваясь перечисленным.

[0111] В некоторых вариантах реализации клетка была выделена от самого больного раком. В некоторых вариантах реализации клетка была предоставлена донором или из банка клеток. Когда клетка выделена от больного раком, нежелательные иммунные реакции могут быть сведены к минимуму.

[0112] Неограничивающие примеры раковых заболеваний включают рак мочевого пузыря, рак молочной железы, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак головы и шеи, рак почки, лейкоз, рак печени, рак легкого, лимфому, меланому, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы и рак щитовидной железы. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой один или более из рака желудка, поджелудочной железы, пищевода, яичника и легкого.

[0113] Дополнительные заболевания или состояния, связанные с повышенной выживаемостью клеток, подлежащие лечению, предупреждению, диагностике и/или прогнозированию с помощью антител или их вариантов или производных согласно изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, прогрессирующие и/или метастазы злокачественных новообразований и ассоциированных расстройств, таких как лейкоз (в том числе острые лейкозы (например, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (в том числе миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный лейкоз и эритролейкоз)) и хронические лейкозы (например, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинная полицитемия, лимфомы (например, болезнь Ходжкина и неходжкинская лимфома), множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей и солидные опухоли, в том числе, не ограничиваясь перечисленными, саркомы и карциномы, такие как фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома ободочной кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома слюнных желез, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечноклеточная карцинома, гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная

карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, акустическая невринома, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома и ретинобластома.

[0114] Конкретная дозировка и режим лечения для любого конкретного пациента будут зависеть от множества факторов, включая конкретные используемые антитела, их вариант или производное, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания пациента, а также время введения, скорость выведения, комбинацию назначенных лекарственных средств и тяжесть конкретного заболевания, подлежащего лечению. Оценка таких факторов медицинскими работниками находится в пределах обычной квалификации специалиста в данной области техники. Количество также будет зависеть от конкретного пациента, подлежащего лечению, способа введения, типа рецептуры, характеристик используемого соединения, тяжести заболевания и желаемого эффекта. Используемое количество может быть определено с помощью фармакологических и фармакокинетических принципов, хорошо известных в данной области техники.

[0115] Способы введения антител или их вариантов включают, не ограничиваясь перечисленным, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Антигенсвязывающие полипептиды или композиции могут быть введены любым подходящим путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальную выстилку или слизистую оболочку (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т. д.), и могут быть введены вместе с другими биологически активными агентами. Таким образом, фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие полипептиды согласно изобретению, могут быть введены перорально, ректально, парентерально, интрацестернально, интравагинально, внутрибрюшинно, местно (например, с помощью порошков, мазей, капель или трансдермального пластыря), буккально или в виде перорального или назального спрея.

[0116] В контексте настоящей заявки термин «парентеральный» относится к способам введения, включающим внутривенную, внутримышечную, внутрибрюшинную, интратермальную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и инфузию.

[0117] Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть желательным введение антител согласно изобретению в центральную нервную систему любым подходящим путем, включая внутрижелудочковую и интратекальную инъекцию; внутрижелудочковая инъекция может быть упрощена с помощью внутрижелудочкового катетера, например, присоединенного к резервуару, такому как резервуар Оммайя. Также может быть использовано пульмональное введение, например, с помощью ингалятора или небулайзера и рецептуры с распыляющим агентом.

[0118] Может быть желательно вводить антигенсвязывающие полипептиды или композиции согласно изобретению местным образом в область, нуждающуюся в лечении; это может быть достигнуто, например, не ограничиваясь перечисленным, путем местной инфузии во время хирургического вмешательства, местного нанесения, например, в сочетании с перевязкой раны после хирургического вмешательства, путем инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, причем указанный имплантат может быть выполнен из пористого, непористого или гелеобразного материала, включая мембраны, такие как мембраны Sikalastic, или волокна. Предпочтительно при введении белка, включая антитело, согласно изобретению необходимо следить, чтобы использовались материалы, не абсорбирующие белок.

[0119] Количество антител согласно изобретению, которое будет эффективным для лечения, ингибирования и предупреждения воспалительного, иммунного или злокачественного заболевания, расстройства или состояния, может быть определено стандартными клиническими способами. Кроме того, необязательно, в качестве вспомогательных средств для установления оптимальных диапазонов дозировок могут быть использованы *in vitro* анализы. Точная доза, которую следует использовать в препарате, также будет зависеть от способа введения и серьезности заболевания, расстройства или состояния, и ее следует выбирать в соответствии с мнением практикующего врача и спецификой каждого пациента. Эффективные дозы могут быть

экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных из систем испытаний *in vitro* или на животных моделях.

[0120] В качестве общего предложения, дозировка антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению, вводимая пациенту, обычно составляет от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела пациента, от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела пациента или от 1 мг/кг до 10 мг/кг массы тела пациента. Как правило, человеческие антитела имеют более длительный период полужизни в организме человека, чем антитела, происходящие из других видов, что связано с иммунным ответом на чужеродные полипептиды. Таким образом, часто возможно использование более низких дозировок человеческих антител и меньшей частоты введения. Кроме того, дозировка и частота введения антител согласно изобретению может быть уменьшена за счет усиления поглощения и проникновения антител в ткани (например, в мозг) с помощью модификаций, таких как, например, липидирование.

[0121] В дополнительном варианте реализации композиции согласно изобретению вводят в комбинации с цитокинами. Цитокины, которые могут быть введены с композициями согласно изобретению, включают, не ограничиваясь перечисленным, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, анти-CD40, CD40L и TNF- α .

[0122] В дополнительных вариантах реализации композиции согласно изобретению вводят в комбинации с другими терапевтическими или профилактическими схемами, такими как, например, радиационная терапия.

Способы диагностики

[0123] Сверхэкспрессия CCR8 наблюдается в некоторых образцах опухолей, и пациенты, имеющие сверхэкспрессирующие CCR8 клетки, вероятно, будут отвечать на лечение антителами к CCR8 согласно настоящему изобретению. Соответственно, антитела согласно настоящему изобретению также могут применяться в целях диагностики и прогнозирования.

[0124] Образец, который предпочтительно включает клетку, может быть получен от пациента, который может представлять собой больного раком или пациента, ожидающего диагностики. Клетка может представлять собой клетку опухолевой ткани или опухолевого блока, образца крови, образца мочи или любого образца от пациента.

После необязательной предварительной обработки образца его можно инкубировать с антителом согласно настоящему изобретению в условиях, обеспечивающих возможность взаимодействия антитела с белком CCR8, потенциально присутствующим в образце. Могут быть использованы такие методы, как ELISA, в которых используют антитело к CCR8 для обнаружения присутствия белка CCR8 в образце.

[0125] Определение присутствия белка CCR8 в образце (необязательно с определением количества или концентрации) может применяться для диагностики рака, как свидетельство того, что пациент подходит для лечения антителом, или как свидетельство того, что пациент ответил (или не ответил) на лечение рака. Для способа прогнозирования обнаружение может быть осуществлено один, два или более раз, на определенных стадиях, после начала лечения рака, чтобы проверить ход лечения.

Композиции

[0126] Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям. Такие композиции содержат эффективное количество антитела и приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации композиция дополнительно включает второй противораковый агент (например, ингибитор иммунных контрольных точек).

[0127] В отдельном варианте реализации термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный федеральным или региональным надзорным органом или указанный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее как подходящий для применения у животных и, более конкретно, у человека. Кроме того, «фармацевтически приемлемый носитель» обычно представляет собой нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательное вещество любого типа.

[0128] Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или наполнителю, с которым вводится терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобные. Вода является предпочтительным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Физиологические растворы и водные

растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобное. Композиция при необходимости может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или буферных агентов, таких как ацетаты, цитраты или фосфаты. Также предусмотрены антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, драже, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и тому подобного. Композиция может быть получена в виде суппозитория с традиционными связующими агентами и носителями, такими как триглицериды. Пероральный препарат может включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния фармацевтической степени чистоты и т. д. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в источнике Remington's Pharmaceutical Sciences за авт. E. W. Martin, включенном в настоящую заявку посредством ссылки. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Препарат должен соответствовать способу введения. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

[0129] В одном варианте реализации рецептура композиции разработана в соответствии с рутинными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буферном растворе. При необходимости композиция может также включать солибилизирующий агент и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Обычно ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо

в виде смеси в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если композиция подлежит введению путем инфузии, она может быть помещена, например, в инфузионный флакон, содержащий стерильную воду фармацевтической степени чистоты или физиологический раствор. Если композиция подлежит введению путем инъекции, может быть обеспечена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, так что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

[0130] Соединения согласно изобретению могут быть включены в состав препарата в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как соли, полученные с соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислотами и т. д., и соли, образованные с катионами, такими как соли, полученные с натрием, калием, аммонием, кальцием, гидроксидами железа (III), изопропиламином, триэтиламином, 2-этиламиноэтанолом, гистидином, прокаином и т. д.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение мышинных моноклональных антител к CCR8 человека

[0131] Белок CCR8 человека использовали для иммунизации различных линий мышей, и соответствующим образом генерировали гибридомы. CCR8-положительные связывающие вещества отбирали и субклонировали. Затем проводили *in vitro* связывание и функциональный скрининг и выявляли лучшие антитела с самой высокой аффинностью связывания и самой сильной функциональной активностью.

[0132] Последовательности VH/VL лучших мышинных антител представлены в таблице ниже.

Таблица 1. Последовательность VH/VL лучших мышинных антител

Название	Последовательность (CDR подчеркнуты)	SEQ ID NO:
137D1H10 VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCTASGFTFN <u>TYAMN</u> WVRQAPGKGL EWV <u>ARIRSKANNYATYADSVK</u> DREFTISRDDSQRI LYLQMNNLKA EDTAMY ^Y CV <u>DRSRGEDYAMDY</u> WGQGTSTVTVSS	1

137D1H10 VL	DI VMTQAAPSVPVTPGESVSI SC <u>RS SKSLLHSNGNTYLY</u> WFLQRP GQSPQLLIY <u>RMSNLAS</u> GVPDRFSGSGSFTAFTLRI SRVEAEDVGV YYC <u>MOHLEYPFT</u> FGAGTKLELK	2
88D2C6 VH	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLS CAASGFTFN <u>PNAMN</u> WVRQAPGKGL EWW <u>ARIRSKSNNYATYYADSVKD</u> RFTISRDDSQSMLYLQMNNLKT EDTAMYYCVR <u>GKDDGYRHYAMDY</u> WGQGT SVTVSS	3
88D2C6 VL	DI VMTQAAPSVPVTPGESVSI SC <u>RS SKSLLHSNGNTYLY</u> WFLQRP GQSPQLLIY <u>RMSNLAS</u> GVPDRFSGSGSFTAFTLRI SRVEAEDVGV YYC <u>MOHLEYPFT</u> FGAGTKLELK	2
89B6F8 VH	DVKLVESGGGLVQPKGSLKLS CAASGFTFS <u>SYTMS</u> WVRQTPEKRL EWW <u>ATISSGDSYTYYPDSVKG</u> RFTISRDNANTLYLRMSSLKSED TAMYYCTR <u>DHYRYDVYAMDY</u> WGQGT SVTVSS	4
89B6F8 VL	DI VMTQSPSSLTVTAGEKV TMSCK <u>KSQSLLNSGNQKNYLT</u> WYQQK PGQPPKLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYC <u>QNDYSYPLT</u> FGAGTKLELK	5
132H8E10 VH	QVQLKESGPGLVAPQSLSITCTVSGFSLT <u>GYAVN</u> WVRQPTGKGL EWL <u>GMIWGDGSTDYNSALKS</u> RLSISKDNSKSVFLKMNSLQTD ARYYCARD <u>SLYGNYPAY</u> WGQGLVTVSA	6
132H8E10 VL	DI QMTQSPSSLSASLGGKVITIC <u>KASQDINKYMA</u> WYQHKPGKGR LLIH <u>STSTLQ</u> PGIPSRFSGSGGRDYSFSISNLEPEDIATYY <u>CLQ</u> <u>YDNLLT</u> FGGGTKLEIK	7
10F11B2 VH	QVQLKESGPGLVQPSQTL SLTCTVSGFSLT <u>SYSVH</u> WVRQHSGKTL VWM <u>GRLWSGDTSYNSAFTS</u> RLSISRDTSKSVFLKMNSLQTE GTYYCAR <u>KAPNGGAFDY</u> WGQGMVTVSS	8
10F11B2 VL	QVVLTPKSVSTSL ESTVKLSCK <u>KLNSGNIGSYVH</u> WYQQHEGRSP TNMIY <u>RDDKRPD</u> GVPDRFSGSIDSSNSAFLTINNVQTEDEAIYF <u>CHSSDSSIKCI</u> FGGGTKLTVL	9
40H10F3 VH	QVQLKESGPGLVQPSQTL SLTCTVSGFSLT <u>SYNVH</u> WVRQPPGKGL EWM <u>GRMRYYGDTSFSSALKS</u> RLSISRDTSKNQVFLKMNSLQTD GTYYCTR <u>GPPSYRGEFDY</u> WGQGMVAVSS	10
40H10F3 VL	DI QMTQSPSLLSASVGDVRTINC <u>KASLNINNYLN</u> WYQKLGAPK LLID <u>NTNNLQ</u> TGIPSRFSGSGGTDYTLTISNLQPEDFGTYFC <u>FQ</u> <u>HNGWPLT</u> FGSGTKLEIK	11
53D6A9 VH	EVQLVESGGSLVQPGRS LKLS CAASGFTYNN <u>NYVMA</u> WVRRAPT KGL EWW <u>VASISTDGVSTQYRDSVKG</u> RFTISRDNAKTSLFLHMDSLRSED TATYYCAK <u>DAARGLYGQGGYFDF</u> WGQGMVTVSS	12
53D6A9 VL	DI QMTQSPASLSASLGETVSI ECL <u>LASEGISNDLAW</u> YQQKSGKSPQ LLIY <u>AATRLEG</u> GVPSRFSGSGGTRFSLKISGMQFED EADYFC <u>QQ</u> <u>SYKYPWT</u> FGGGTKLELK	13
352H11C11 VH	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLS CAASGFTFN <u>TNAMN</u> WVRQAPGKGL EWW <u>ARIRSKSNNYATYYADSVKD</u> RFTISRDDSQSILYLQMNNLKT EDTAMYYCVR <u>GGPIYHMD</u> WGQGT SVTVSS	14
352H11C11 VL	DI VMTQAAPSVPVTPGESVSI SC <u>RS SKSLLHSNGNTYLY</u> WFLQRP GQSPQLLIY <u>RMSNLAS</u> GVPDRFSGSGSFTAFTLRI SRVEAEDVGV YYC <u>MOHLEYPFT</u> FGSGTKLEIK	15
362G7D3 VH	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLS CAASGFTFN <u>TNAMN</u> WVRQAPGKGL EWW <u>ARIRSKSNNYATYYADSVKD</u> RFTISRDDSQSMLYLQMNNLKT EDTAMYYCVR <u>DPLRQMDY</u> WGQGT SVTVSS	16
362G7D3 VL	DI VMTQAAPSVPVTPGESVSI SC <u>RS SKSLLHSNGNTYLY</u> WFLQRP GQSPQLLIY <u>RMSNLAS</u> GVPDRFSGSGSFTAFTLRI SRVEAEDVGV YYC <u>MOHLEYPFT</u> FGSGTKLEIK	15
362H10A3 VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLS CAASGFTFN <u>TYAMN</u> WVRQAPGKGL EWW <u>ARIRSKSNNYATYYADSVKD</u> RFTISRDDSQSMLYLQMNNLKT EDTAMYYCVR <u>GGGNYRGDYFDY</u> WGQGTTLTVSS	17

362H10A3 VL	DI VMTQAAPSVPVTPGESVSI SC <u>RS SKSLLHSNGNTYLY</u> WFLQRP GQSPQLLIY <u>RMSNLAS</u> GVPDRFSGSGSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYC <u>MOHLEYPFT</u> FGSGTKLEIK	15
367D10E7 VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFN <u>TYAMN</u> WVRQAPGKGL EWW <u>RI RSKSNNYATYYADSVKD</u> RFTISRDDSQSMLYLQMNNLKT EDTAMYYCVRY <u>DRSYAMDY</u> WGQGTSTVTVSS	18
367D10E7 VL v1	QIVLTQSPAISASPGKVTITC <u>SASSVSYMH</u> WFQKPGTSPKL WIY <u>STSNLAS</u> GVPARFSGSGGTSYSLTISRMEAEADAATYYC <u>QQR</u> <u>SSYPLT</u> FGAGTKLEIK	19
367D10E7 VL v2	DI VMTQAAPSVPVTPGESVSI SC <u>RS SKSLLHSNGNTYLY</u> WFLQRP GQSPQLLIY <u>RMSNLAS</u> GVPDRFSGSGSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYC <u>MOHLEYPFT</u> FGAGTKLEIK	2
370D2C10 VH	EVQLIETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFN <u>TNAMN</u> WVRQAPGKDL EWW <u>RI RSKSNNYATYYADSVKD</u> RFTISRDDSQSMLYLQMNNLKT EDTAMYYCVT <u>GTTVVAKEFAY</u> WGQGTSLTVSA	20
370D2C10 VL	DI VMTQAAPSVPVTPGESVSI SC <u>RS SKSLLHSNGNTYLY</u> WFLQRP GQSPHLLIY <u>RMSNLAS</u> GVPDRFSGSGSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYC <u>MOHLEYPFT</u> FGSGTKLEIK	21

Пример 2. Связывание с CCR8 на клетках U2OS

[0133] В этом примере исследовали активность антител в отношении связывания с белком CCR8 человека, экспрессируемым на клетках U2OS.

[0134] Химерные антитела (слитые с константными областями IgG1 человека) нескольких из выявленных выше мышинных антител экспрессировали из кДНК. Антитела инкубировали с клетками U2OS, экспрессирующими CCR8 человека. Среди тестируемых антител 88D2C6 и 137D1H10 продемонстрировали значительно более высокую аффинность, чем остальные, дозозависимым образом (ФИГ. 1).

Пример 3. Измерение АЗКЦ

[0135] Эффективность 88D2C6 и 137D1H10, наряду с 370D2C10 (все были слиты с константными областями IgG1 человека с АЗКЦ-активирующими мутациями в Fc) в отношении опосредования АЗКЦ измеряли с помощью клеток CHO K1 и U2OS, сверхэкспрессирующих CCR8. Все три антитела демонстрировали высокую активность АЗКЦ (ФИГ. 2).

[0136] Все три антитела демонстрировали высокую активность АЗКЦ. Однако, среди них 88D2C6 обладало значительно более высокой активностью (EC50: 0,01743 нМ с клетками CHO и 0,1108 для клеток U2OS).

Пример 4. Гуманизация мышиных mAb

[0137] Гены переменных областей мышиных антител 88D2C6 и 352H11C11 were использовали для создания гуманизованных mAb. Аминокислотные последовательности VH и VL mAb сравнивали с доступной базой данных последовательностей генов Ig человека, чтобы найти наиболее совпадающие последовательности генов зародышевой линии Ig человека. Затем CDR мышиных антител прививали на соответствующие человеческие последовательности. Синтезировали кДНК и использовали для получения гуманизованных антител. Некоторые обратные мутации из мышиных антител затем вводили обратно в гуманизованные антитела. Некоторые аминокислоты мутировали, чтобы уменьшить вероятность посттрансляционной модификации.

[0138] Аминокислотные последовательности гуманизованных антител представлены ниже.

Гуманизованные последовательности

А. 88D2C6

Таблица 2А. Гуманизация 88D2C6 – VH

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
88D2C6 VH	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNPAMN W VRQAPGKGL EWVARI R SKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSM L YLQMN N LKT EDTAMY C VRGKDDGYRHYAMDYWGQGTSTVTVSS	3
V1 (привитие CDR)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNPAMN W VRQASGKGL E W VGRIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN N LKT EDTAVYYC T RGKDDGYRHYAMDYWGQGTSTVTVSS	29
V2 (с обратными мутациями)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNPAMN W VRQASGKGL E W VGRIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN N LKT EDTAVYYC V RGKDDGYRHYAMDYWGQGTSTVTVSS	30
V3 (с обратными мутациями)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNPAMN W VRQASGKGL E W VARI R SKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT L YLQMN N LKT EDTAVYYC V RGKDDGYRHYAMDYWGQGTSTVTVSS	31

Таблица 2В. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	PNAMN	22
CDR-H2	RIRSKSNNYATYYADSVKD	23
CDR-H3	GKDDGYRHYAMDY	24

Таблица 2С. Гуманизация 88D2C6 – VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
88D2C6 VL	DI VMTQAAPSVPVTPGESVSI SCRSSKSLLSNGNTYLYWFLQRP GQSPQLLI YRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAF T LRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYPFTFGAGTKLELK	2
V1 (привитие CDR)	DI VMTQSP L S LPVTPGEPASISCRSSKSLLSN A NTYLYWYLQKP GQSPQLLI YRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDF T LKI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYPFTFGGGTKVEIK	32
V2 (с обратными мутациями)	DI VMTQSP L S LPVTPGEPASISCRSSKSLLSN A NTYLYW F LQKP GQSPQLLI YRMSNLASGVPDRFSGSGSGT A F T LKI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYPFTFGGGTKVEIK	33
V3 (с обратными мутациями)	DI VMTQ A PLS LPVTPGEP V SISCRSSKSLLSN A NTYLYW F LQKP GQSPQLLI YRMSNLASGVPDRFSGSGSGT A F T LKI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYPFTFGGGTK L EIK	34

Таблица 2D. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	RSSKSLLSNGNTYLY	28
CDR-L1 (сайт ПМ мутирован)	RSSKSLLSN A NTYLY	25
CDR-L2	RMSNLAS	26
CDR-L3	MQHLEYPFT	27

Таблица 2E. Гуманизированные антитела

	VL	VL v1	VL v2	VL v3
VH	88-xi			
VH v1			88-H1L2	88-H1L3
VH v2			88-H2L2	88-H2L3
VH v3			88-H3L2	88-H2L3

B. 137D1H10

Таблица 3A. Гуманизация 137D1H10 – VH

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
137D1H10 VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCTASGFTFNTYAMN W VRQAPGKGL EWVARI R SKANNYATYYADSVKDRFTISRDDSQRI LYLQMN N LKA EDTAVYYC V RD R SRGEDYAMDYWGQGTSLTVSS	1
V1 (привитие CDR)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMN W VRQASGKGL E W VGRIRSKANNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN S LKT EDTAVYYC T SD R SRGEDYAMDYWGQGTSLTVSS	38
V2 (с обратными мутациями)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMN W VRQASGKGL E W VGRIRSKANNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN N LKT EDTAVYYC V R D SRGEDYAMDYWGQGTSLTVSS	39
V3 (с обратными мутациями)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMN W VRQASGKGL E W V A RIRSKANNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT L YLQMN N LKT EDTAVYYC V R D SRGEDYAMDYWGQGTSLTVSS	40

Таблица 3B. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-H1	TYAMN	35
CDR-H2	RIRSKANNYATYYADSVKD	36
CDR-H3	DRSRGEDYAMDY	37

Таблица 3C. Гуманизация 137D1H10 – VL

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
137D1H10 VL	DI VMTQAAPSVPVTPGESVSI SCRSSKSL LHSNGNTYLYWFLQRP GQSPQLLI YRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAF T TLRISRVEAEDVGV YYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK	2
V1 (привитие CDR)	DI VMTQSP L SLPVT P GP E PASISCRSSKSL LHSN A NTYLYWYLQKP GQSPQLLI YRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDF T TLKISRVEAEDVGV YYCMQHLEYPFTFGQGTKLEIK	41
V2 (с обратными мутациями)	DI VMTQSP L SLPVT P GP E PASISCRSSKSL LHSN A NTYLYW F LQKP GQSPQLLI YRMSNLASGVPDRFSGSGSGT A F T TLKISRVEAEDVGV YYCMQHLEYPFTFGQGTKLEIK	42
V3 (с обратными мутациями)	DI VMTQSP L SLPVT P GP E P V SISCRSSKSL LHSN A NTYLYW F LQKP GQSPQLLI YRMSNLASGVPDRFSGSGSGT A F T TLKISRVEAEDVGV YYCMQHLEYPFTFGQGTKLEIK	43

Таблица 3D. Последовательности CDR

CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR-L1	RSSKSL LHSNGNTYLY	28
CDR-L1 (сайт ПИМ мутирован)	RSSKSL LHSN A NTYLY	25
CDR-L2	RMSNLAS	26
CDR-L3	MQHLEYPFT	27

Таблица 3E. Гуманизированные антители

	VL	VL v1	VL v2	VL v3
VH	137-xi			
VH v1				
VH v2			137-H2L2	137-H2L3
VH v3			137-H3L2	137-H3L3

Пример 5. Тестирование гуманизированных антител

[0139] В данном примере тестировали некоторые из гуманизированных антител на их аффинность связывания с CCR8 и их способность индуцировать АЗКЦ.

[0140] Методики экспериментов аналогичны примерам 2-3. На **ФИГ. 3** показаны аффинности гуманизированных антител на основе 88D2C6. По-видимому, все они обладали высокой аффинностью (см. также Таблицу 4).

Таблица 4А. Связывание с CCR8, экспрессируемым в клетках CHO-K1

	88-H1L2	88-H1L3	88-H2L2	88-H2L3	88-H3L2	88-H3L3	88-xi
Нижнее	2669	2143	2494	2276	3937	3474	3631
Верхнее	32782	31947	32830	31610	32495	32214	33947
LogEC50	-0,7515	-0,5189	-0,6391	-0,5461	-0,6861	-0,5826	-0,6548
Угловой коэффициент Хилла	1,502	1,377	1,404	1,408	1,382	1,345	1,480
EC50	0,1772	0,3028	0,2296	0,2844	0,2060	0,2615	0,2214
Диапазон	30113	29804	30336	29334	28557	28740	30316

Таблица 4В. Связывание с CCR8, экспрессируемым в клетках U2OS

	88-H1L2	88-H1L3	88-H2L2	88-H2L3	88-H3L2	88-H3L3	88-xi
Нижнее	2106	1542	2756	1530	2826	1623	1027
Верхнее	28891	27635	28329	25780	27435	27421	29659
LogEC50	-0,6779	-0,5797	-0,7241	-0,5119	-0,6841	-0,6289	-0,6921
Угловой коэффициент Хилла	1,409	1,387	1,524	1,450	1,521	1,378	1,097
EC50	0,2099	0,2632	0,1888	0,3077	0,2070	0,2350	0,2032
Диапазон	26785	26092	25574	24250	24609	25798	28632

[0141] На **ФИГ. 4** показаны аффинности гуманизированных антител на основе 137D1H10 (данные в Таблице 5).

Таблица 5А. Связывание с CCR8, экспрессируемым в клетках CHO-K1

	137-H2L2	137-H2L3	137-H3L2	137-H3L3	137-xi
Нижнее	2548	2244	4264	3820	3032
Верхнее	29347	30182	33198	33389	34947
LogEC50	-0,7893	-0,5055	-0,6843	-0,7538	-0,7792
Угловой коэффициент Хилла	1,141	1,272	1,592	1,449	1,581
EC50	0,1625	0,3123	0,2069	0,1763	0,1663
Диапазон	26799	27937	28934	29569	31915

Таблица 5В. Связывание с CCR8, экспрессируемым в клетках U2OS

	137-H2L2	137-H2L3	137-H3L2	137-H3L3	137-xi
Нижнее	915,4	1322	2065	2098	2172
Верхнее	26251	27254	32257	31927	33430
LogEC50	-0,8422	-0,4841	-0,6897	-0,7169	-0,6052
Угловой коэффициент Хилла	1,171	1,122	1,351	1,492	1,422
EC50	0,1438	0,3280	0,2043	0,1919	0,2482
Диапазон	25336	25932	30192	29829	31258

[0142] С точки зрения АЗКЦ (**ФИГ. 5**) все гуманизированные антитела неожиданно проявляли значительно более высокую (приблизительно в 5-10 раз) АЗКЦ-индуцирующую активность, чем химерные аналоги.

Пример 6. Клеточное связывание антитела

[0143] В этом примере сравнивали 137-H3L2 (LM-108) с эталонными антителами в отношении клеточного связывания.

[0144] Клеточное связывание LM-108 и эталонного антитела (синтезированного согласно WO2020138489) с клетками, сверхэкспрессирующими CCR8 человека (НЕК293/Н_CCR8), оценивали с использованием проточной цитометрии. Клетки НЕК293, сверхэкспрессирующие CCR8 человека (НЕК293/Н_CCR8), и родительские клетки НЕК293 инкубировали с возрастающими дозами LM-108, эталонным антителом и его изотипическим контролем (от 200 нМ, 4-х кратные разведения, 12 точек) при 4 °С в течение 60 минут. Клетки дважды промывали буфером FACS, затем окрашивали конъюгированным с флуоресцентной меткой вторичным антителом (Alexa Fluor® 647 козий античеловеческий IgG, Jackson, 109-605-098) при 4 °С в течение 60 минут. После этого клетки дважды промывали и анализировали с помощью проточной цитометрии.

[0145] И LM-108, и эталонное антитело эффективно связывались с клетками НЕК293/Н_CCR8 дозозависимым образом с EC₅₀, равной 1,03 нМ и 0,99 нМ, соответственно (**ФИГ. 6а** и **Таблица 6А**). Неспецифическое связывание не наблюдалось для LM-108, но эталонное антитело продемонстрировало небольшое неспецифическое связывание на родительских клетках НЕК293 (**ФИГ. 6б** и **Таблица 6В**).

Таблица 6А. Связывание с клетками HEK293, экспрессирующими CCR8

Антитело	EC50 (нМ)	Макс. (MFI)
LM-108	1,028	76795
Эталонное антитело	0,9938	86817
Изотип	Н/Д	192

Таблица 6В. Связывание с клетками HEK293, не экспрессирующими CCR8

Антитело	EC50 (нМ)	Макс. (MFI)
LM-108	Н/Д	108
Эталонное антитело	Н/Д	472
Изотип	Н/Д	145

[0146] Клеточное связывание LM-108 на клетках с высокими уровнями экспрессии CCR8 оценивали с использованием проточной цитометрии. Используемые клетки представляли собой U2OS (U2OS/Н_CCR8). Как показано на **ФИГ. 7** и в **Таблице 7**, LM-108 могло эффективно связываться с клетками U2OS/Н_CCR8 дозозависимым образом с EC₅₀, равной 0,25 нМ.

Таблица 7. Связывание с клетками U2OS с высоким уровнем экспрессии CCR8

Антитело	EC50 (нМ)	Макс. (MFI)
LM-108	0,2503	43087
Изотип	Н/Д	215

[0147] Клеточное связывание LM-108 на клетках с низкими уровнями экспрессии CCR8 также оценивали с использованием проточной цитометрии. Используемые клетки представляли собой генетически модифицированные клетки Jurkat (Jurkat/Н_CCR8). Как показано на **ФИГ. 8** и в **Таблице 8**, LM-108 могло эффективно связываться с клетками Jurkat/Н_CCR8 дозозависимым образом с EC₅₀, равной 0,21 нМ.

Таблица 8. Связывание с клетками Jurkat с низким уровнем экспрессии CCR8

Антитело	EC50 (нМ)	Макс. (MFI)
LM-108	0,2124	1423
Изотип	Н/Д	134

Пример 7. Репортерный генный анализ АЗКЦ

[0148] В этом примере показаны результаты репортерного генного анализа АЗКЦ с различными ССR8-экспрессирующими клетками в качестве мишени.

Репортерный генный анализ АЗКЦ с U2OS/H_CCR8 в качестве мишени

[0149] Активность АЗКЦ LM-108 оценивали с помощью репортерного генного анализа с репортерными клетками Jurkat/NFAT-luc, экспрессирующими CD16a (158v), в качестве эффекторных клеток. Клетки U2OS, сверхэкспрессирующие ССR8 человека, использовали в качестве клеток-мишеней. Клетки U2OS/H_CCR8 высевали при плотности $1E4$ клеток на лунку в 96-луночный планшет на ночь, затем культивировали совместно с $1,5 \times 10^5$ эффекторных клеток в каждой лунке и возрастающими дозами LM-108 и изотипического контроля до конечной концентрации от 10 мкг/мл, 5-кратные разведения, 10 точек. После инкубации при 37 °С в течение 6 часов добавляли One-Glo (Promega) для обнаружения люминесценции.

[0150] Результаты показаны на **ФИГ. 9**. LM-108 продемонстрировало сильный эффект АЗКЦ ($EC_{50}=0,00605$ нМ) с репортерными клетками Jurkat/CD16a/NFAT-luc, нацеленный на клетки U2OS/H_CCR8.

Репортерный генный анализ АЗКЦ с Jurkat/H_CCR8 в качестве мишени

[0151] Активность АЗКЦ LM-108 оценивали с помощью репортерного генного анализа с репортерными клетками Jurkat/NFAT-luc, экспрессирующими CD16a (158v), в качестве эффекторных клеток. Клетки Jurkat с низким уровнем экспрессии ССR8 человека генерировали в качестве клеток-мишеней для имитации уровня экспрессии на опухолеассоциированных Treg.

[0152] Эффекторные клетки (репортерная клетка Jurkat) и клетки-мишени (Jurkat/H_CCR8) в соотношении 3:1 смешивали с возрастающими дозами LM-108 и изотипического контроля (конечная концентрация от 200 нМ, 5-кратные разведения, 11 точек). После инкубации при 37 °С в течение 6 часов добавляли One-Glo (Promega) для обнаружения люминесценции. Как показано на **ФИГ. 10**, LM-108 обладало дозозависимым эффектом АЗКЦ с $EC_{50}=0,14$ нМ.

Эффект АЗКЦ LM-108 в отношении клеток HEK293 (HEK293/H_CCR8), сверхэкспрессирующих CCR8 человека, и HEK293 с первичными РВМС человека

[0153] Эффекторные клетки (hРВМС) и клетки-мишени (HEK293/H_CCR8 или HEK293) в соотношении 50:1 смешивали с возрастающими дозами LM-108 и изотипического контроля (конечная концентрация от 10 нМ, 7-кратные разведения, 12 точек). После инкубации при 37 °С в течение 6 часов 50 мкл супернатанта из каждой лунки анализировали с помощью набора для определения цитотоксичности (Roche, 04744934001).

[0154] Как показано на **ФИГ. 11А**, LM-108 продемонстрировало специфичный и сильный эффект АЗКЦ в отношении клеток HEK293, экспрессирующих CCR8, дозозависимым образом с EC₅₀, равной 0,002 нМ (ФИГ. 6а). На родительских клетках HEK293 не наблюдалось неспецифического уничтожения (**ФИГ. 11В**).

Пример 8. Тестирование антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ)

[0155] В этом примере оценивали эффект антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ) LM-108 в отношении клеток CHO-K1, сверхэкспрессирующих CCR8 человека, с помощью макрофагов моноцитарного происхождения (MDM) методом FACS.

[0156] Эффекторные клетки, MDM, индуцировали из моноцитов, выделенных из РВМС человека, в присутствии 100 нг/мл М-CSF человека в течение 7 дней. Клетки-мишени представляли собой CHO-K1 (отрицательный контроль) и клетки CHO-K1, сверхэкспрессирующие CCR8 человека, меченые CFSE. Эффекторные клетки, меченые CFSE клетки-мишени и возрастающие дозы тестируемого антитела LM-108 или его изотипического контроля инкубировали в инкубаторе при 37 °С, 5% CO₂ в течение 2 часов. Клетки промывали буфером FACS (1 x DPBS + 2% FBS), затем окрашивали APC-конъюгированным антителом к CD14 человека для идентификации макрофагов. После двукратного промывания буфером FACS образцы анализировали с помощью проточной цитометрии. Фагоцитарный индекс определяли как процент CD14-APC+/CFSE+ дважды положительных клеток в общем количестве CD14+ положительных клеток.

[0157] Как показано на **ФИГ. 12А-В**, LM-108 обладало специфичным и дозозависимым фагоцитозом в отношении клеток СНО-К1, сверхэкспрессирующих CCR8 человека, но не контрольных клеток.

[0158] АЗКФ LM-108 с макрофагами моноцитарного происхождения (MDM) также измеряли с помощью Operetta. Эффекторные клетки, MDM, индуцировали из моноцитов, выделенных из PBMC человека, в присутствии 100 нг/мл M-CSF человека в течение 6 дней. Затем эффекторные клетки высевали в черный 96-луночный планшет с прозрачным дном в количестве 2×10^4 на лунку и культивировали еще 2 дня для адгезии. Клетки-мишени представляли собой клетки Jurkat (отрицательный контроль) и Jurkat, сверхэкспрессирующие CCR8 человека (Jurkat/H_CCR8). Меченые CFSE клетки-мишени и тестируемое антитело LM-108 или его изотипический контроль добавляли в планшет с макрофагами и инкубировали в инкубаторе при 37 °C, 5% CO₂ в течение 2 часов. Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней составляло 1:2. Клетки промывали и окрашивали APC-конъюгированным антителом к CD14 человека для идентификации макрофагов. После двукратного промывания клетки фиксировали с использованием 4% разведения параформальдегида (PFA) и хранили в морозильной камере при 4 °C в темноте, прежде чем фотографировать с помощью Operetta.

[0159] Как показано на **ФИГ. 13**, LM-108 индуцировало АЗКФ в отношении клеток Jurkat, сверхэкспрессирующих CCR8 человека, в то время как его изотипический контроль не обладал такой активностью. Ни LM-108, ни изотипический контроль не индуцировали явного фагоцитоза в отношении клеток Jurkat.

Пример 9. Эффективность *in vivo*

[0160] В этом примере были проведены исследования эффективности LM-108 или его мышинового суррогата *in vivo*.

[0161] Первый эксперимент проводили на сингенной модели СТ26 с LM-108m, суррогатным антителом для LM-108. В этом исследовании каждой мыши инокулировали подкожно в правую подмышечную впадину (латерально) опухолевые клетки СТ26 (5×10^5) в 0,1 мл PBS для развития опухоли. Животных случайным образом разделяли на 4 группы (n=7) на третий день после инокуляции клеток, а затем начинали лечение. Группу PBS в качестве носителя, LM-108m и антитело к mPD-1 в

дозе 10 мг/кг вводили через внутрибрюшинно (в/б) в виде монотерапии или в комбинации в день 0, день 3, день 7, день 10, день 14 и день 17. Эксперимент был прекращен на 18-й день из-за того, что средний объем опухоли контрольной группы достиг более 2000 мм³.

[0162] Размеры опухолей измеряли три раза в неделю в двух направлениях с помощью штангенциркуля, и объем выражали в мм³ по формуле: $V = 0,5 a \times b^2$, где a и b представляли собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно. Затем размеры опухолей использовали для расчета значений Т/С (%). Т/С (%) рассчитывали по формуле: $T/C \% = (T_i - T_0) / (V_i - V_0) \times 100$, T_i представлял собой средний объем опухоли в группе лечения в данный день, T_0 представлял собой средний объем опухоли в группе лечения в первый день лечения, V_i представлял собой средний объем опухоли в контрольной группе носителя в тот же день, что и для T_i , и V_0 представлял собой средний объем опухоли в группе носителя в первый день лечения. TGI (ингибирование роста опухоли) рассчитывали для каждой группы по формуле: $TGI (\%) = [100 - T/C]$.

[0163] На **ФИГ. 14** показана кривая роста опухоли мышей Balb/c с опухолями CT26 после введения LM-108m и антитела к mPD-1. LM-108m в качестве монотерапии или в комбинации с антителом к mPD-1 продемонстрировало сильную противоопухолевую активность (**Таблица 9**). Точки на графике представляют собой среднее значение по группе (n=7), планки погрешности представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM). Р-значение было рассчитано на основе размера опухоли с помощью t-критерия по сравнению с контролем носителем с использованием PBS.

Таблица 9. Эффективность *in vivo* (сингенная модель CT26)

Дни после лечения Т/С(%)	0	3	6	9	12	15	18
Г2: LM-108m, 10 мг/кг	-	72,161	86,504	54,453	47,024	35,639	28,219
Г3: Антитело к mPD-1, 10 мг/кг	-	59,926	70,322	44,463	38,057	35,773	38,326
Г4: LM-108m+антитело к mPD-1	-	70,506	60,774	35,973	27,413	20,386	15,292

Дни после лечения TGI(%)	0	3	6	9	12	15	18
Г2: LM-108m, 10 мг/кг	-	27,839	13,496	45,547	52,976	64,361	71,781
Г3: антитело к mPD-1, 10 мг/кг	-	40,074	29,678	55,537	61,943	64,227	61,674

Г4: LM-108m+антитело к mPD-1	-	29,494	39,226	64,027	72,587	79,614	84,708
------------------------------	---	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Дни после лечения Р-значение	0	3	6	9	12	15	18
Г2: LM-108m, 10 мг/кг	-	0,053	0,385	0,024	0,026	0,025	0,023
Г3: Антитело к mPD-1, 10 мг/кг	-	0,024	0,073	0,007	0,008	0,026	0,044
Г4: LM-108m+антитело к mPD-1	-	0,037	0,017	0,002	0,006	0,01	0,012

[0164] Во втором эксперименте использовали мышей с нокином CCR8 человека, которые были приобретены у BIOCYTOGEN. Каждой мышке с нокином hCCR8 инокулировали подкожно в правую подмышечную впадину (латерально) опухолевые клетки MC38 (1×10^6) в 0,1 мл PBS для развития опухоли. Животных случайным образом разделяли на группы на третий день после инокуляции клеток, а затем начинали лечение для исследования эффективности. LM-108 в дозе 10 мг/кг вводили внутривенно (в/в) в день 0, день 3, день 7, день 10. Эксперимент был прекращен, когда средний объем опухоли контрольной группы достиг более 2000 мм³.

[0165] Размеры опухолей измеряли три раза в неделю в двух направлениях с помощью штангенциркуля, и объем выражали в мм³ по формуле: $V = 0,5 a \times b^2$, где a и b представляли собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно. Затем размеры опухолей использовали для расчета значений T/C (%). T/C (%) рассчитывали по формуле: $T/C \% = (T_i - T_0) / (V_i - V_0) \times 100$, T_i представлял собой средний объем опухоли в группе лечения в данный день, T_0 представлял собой средний объем опухоли в группе лечения в первый день лечения, V_i представлял собой средний объем опухоли в контрольной группе носителя в тот же день, что и для T_i , и V_0 представлял собой средний объем опухоли в группе носителя в первый день лечения. TGI рассчитывали для каждой группы по формуле: $TGI (\%) = [100 - T/C]$. Точки на графике представляют собой среднее значение по группе ($n=8$), планки погрешности представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM). Р-значение было рассчитано на основе размера опухоли с помощью t-критерия по сравнению с контролем носителем.

[0166] На **ФИГ. 15** показана кривая роста опухоли у мышей с опухолями MC38 после введения LM-108, и данные обобщены в **Таблице 10**. LM-108 продемонстрировало сильные эффекты ингибирования опухоли.

Таблица 10. Эффективность *in vivo* (сингенная модель МС38)

Р-значение	Дни после лечения						
	0	2	4	7	9	11	14
LM-108 по сравнению с носителем	-	0,985	0,503	0,042	0,002	0	0,001

Т/С(%)	Дни после лечения						
	0	3	5	7	10	12	14
LM-108 по сравнению с носителем	-	99,68	95,326	73,673	47,349	34,464	31,23

TGI(%)	Дни после лечения						
	0	3	5	7	10	12	14
LM-108 по сравнению с носителем	-	0,32	4,674	26,327	52,651	65,536	68,77

Пример 10. Оценка цитотоксичности

[0167] В этом примере оценивали цитотоксичность конъюгата антитело-лекарственное средство, LM-108-vc-MMAE (монометил ауристатин E), на клетках НЕК293, экспрессирующих CCR8 человека.

[0168] Чтобы оценить, можно ли применять LM-108 для разработки ADC (конъюгата антитело-лекарственное средство), оценивали цитотоксичность MMAE, конъюгированного с LM-108, путем совместного культивирования клеток НЕК293, экспрессирующих CCR8 человека, и возрастающих доз ADC LM-108-vc-MMAE.

[0169] Клетки НЕК293/Н_CCR8 высевали с плотностью $1,5 \times 10^4$ клеток на лунку в 96-луночный планшет на ночь, затем культивировали совместно с возрастающими дозами LM-108-vc-MMAE до конечной концентрации от 100 нМ, 3-кратные разведения, 9 точек. После инкубации при 37 °С в течение 96 часов добавляли Cell-Titer-Glo (Promega) для оценки жизнеспособности клеток.

[0170] Как показано на **ФИГ. 16**, конъюгированное с MMAE LM-108 обладало сильной цитотоксичностью (IC₅₀= 0,5285 нМ) в отношении клеток НЕК293, экспрессирующих CCR8 человека.

* * *

[0171] Объем настоящего изобретения не должен быть ограничен отдельными описанными вариантами реализации, которые играют роль отдельных иллюстраций конкретных аспектов изобретения, и любые композиции или способы, которые являются функционально эквивалентными, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будет ясно, что способы и композиции согласно настоящему изобретению могут быть подвергнуты различным модификациям и вариациям без отклонения от сущности или объема изобретения. Таким образом, подразумевается, что настоящее изобретение охватывает его модификации и вариации при условии, что они входят в объем прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

[0172] Все публикации и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретным и индивидуальным образом включена посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с белком хемокинового (мотив С-С) рецептора 8 (CCR8) человека, где указанные антитело или его фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и где:

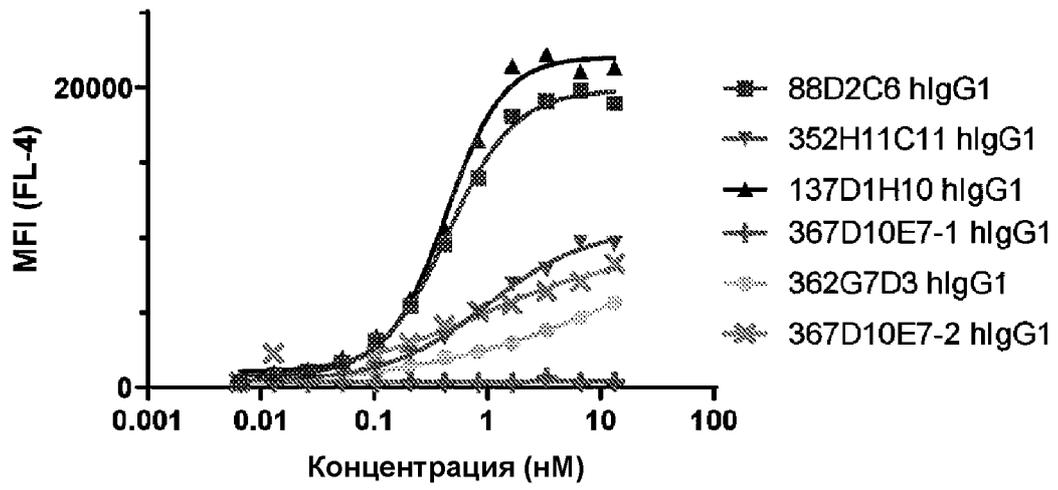
- (a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 28, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, или
- (b) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или 28, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

2. Антитело или его фрагмент по п. 1, где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

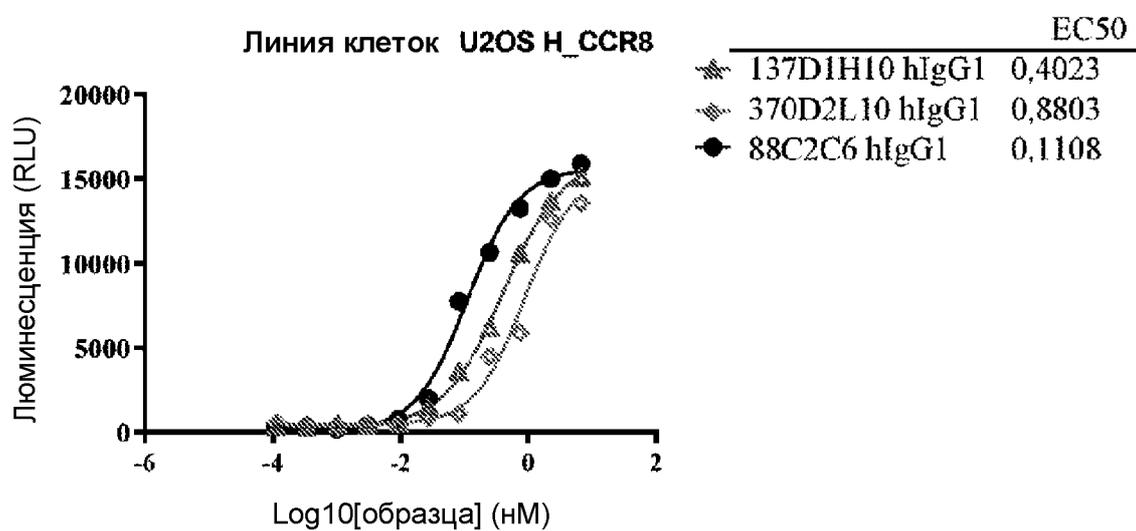
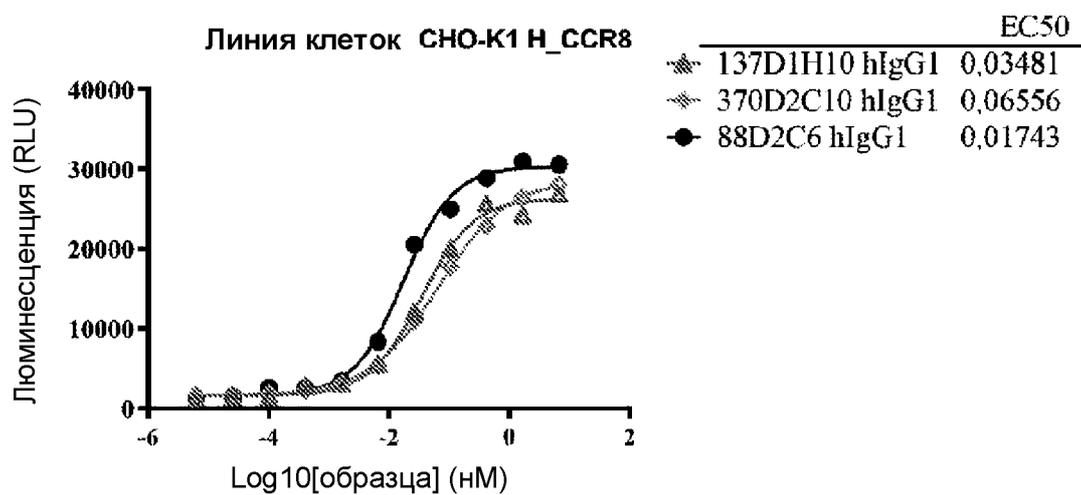
3. Антитело или его фрагмент по п. 2, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38-40, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32-34 и 41-43.
4. Антитело или его фрагмент по п. 2, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.
5. Антитело или его фрагмент по п. 1, где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.
6. Антитело или его фрагмент по п. 5, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-31, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32-34 и 41-43.
7. Антитело или его фрагмент по п. 5, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.
8. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-7, которые являются гуманизированными.

9. Антитело или его фрагмент, которые обладают специфичностью связывания с белком хемокинового (мотив C-C) рецептора 8 (CCR8) человека и связываются с тем же эпитопом на белке CCR8, что и антитело или его фрагмент по п. 1, или конкурируют с антителом или его фрагментом по п. 1 за связывание с белком CCR8.
10. Антитело или фрагмент по любому из пп. 1-9, способные опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ).
11. Антитело или его фрагмент по п. 10, которые не являются афукозилированными.
12. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-11, которые дополнительно обладают специфичностью связывания со вторым белком-мишенью.
13. Композиция, содержащая антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-12 и фармацевтически приемлемый носитель.
14. Композиция по п. 13, дополнительно содержащая второе антитело, обладающее специфичностью к опухолевому антигену.
15. Способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-12.
16. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-12 для получения лекарственного средства для лечения рака.

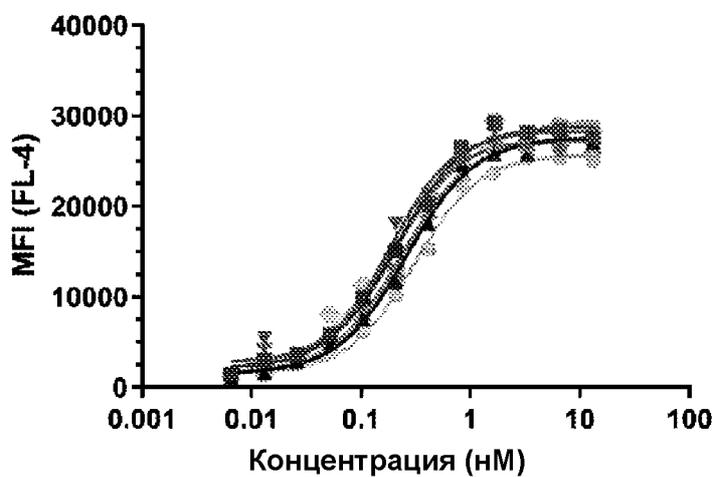
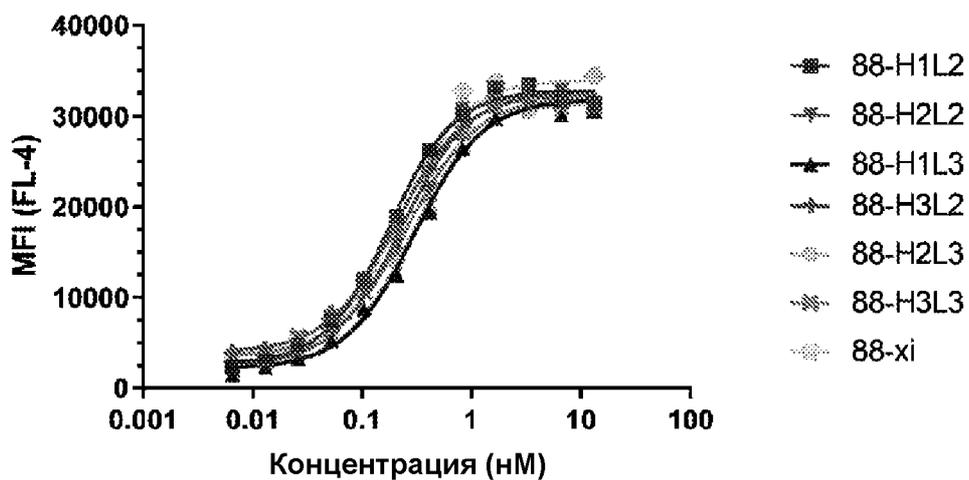
17. Способ по п. 15 или применение по п. 16, где указанный рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака печени, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, лейкоза, лимфомы, рака поджелудочной железы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака уретры, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака пищевода, рака яичника, рака почки, меланомы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы.



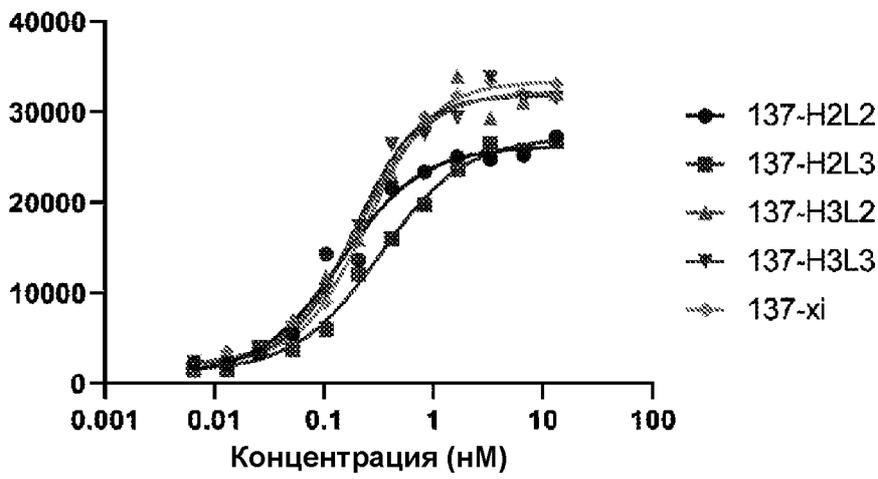
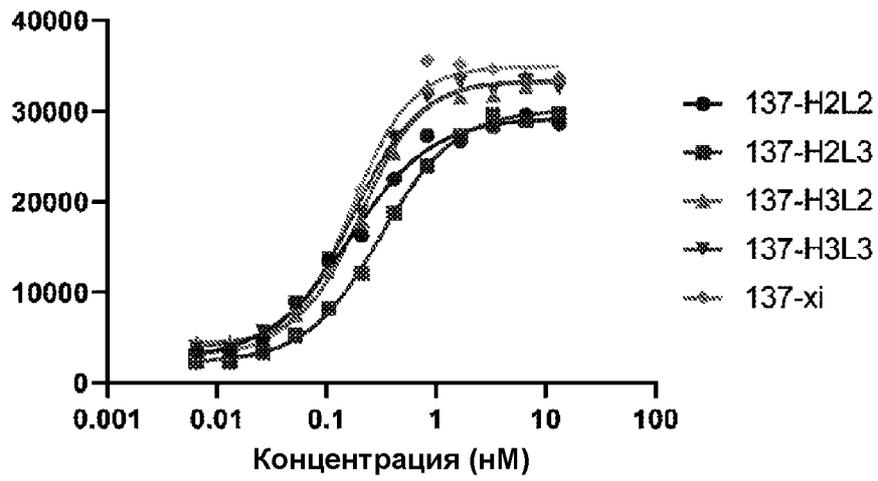
ФИГ. 1



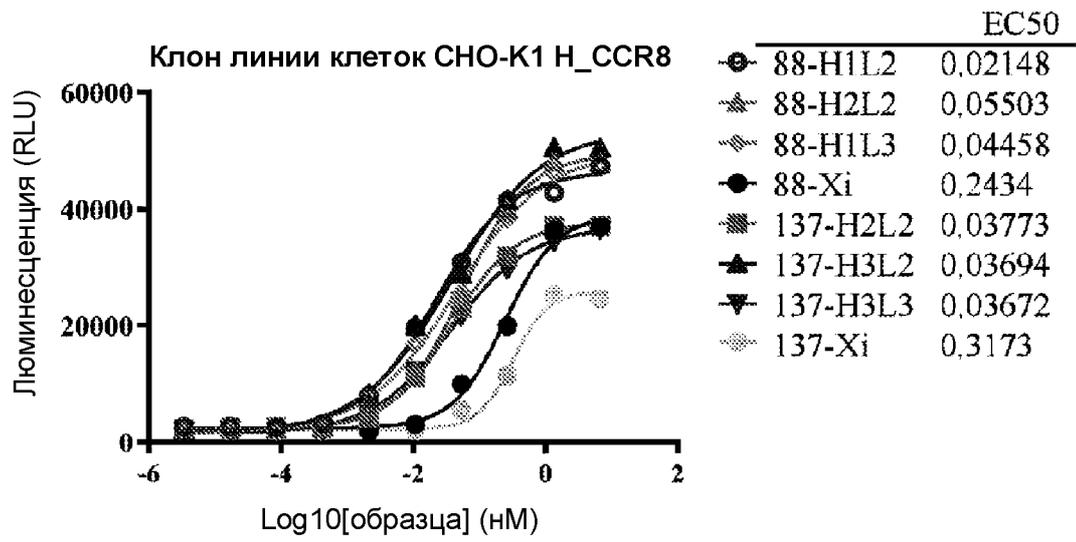
ФИГ. 2



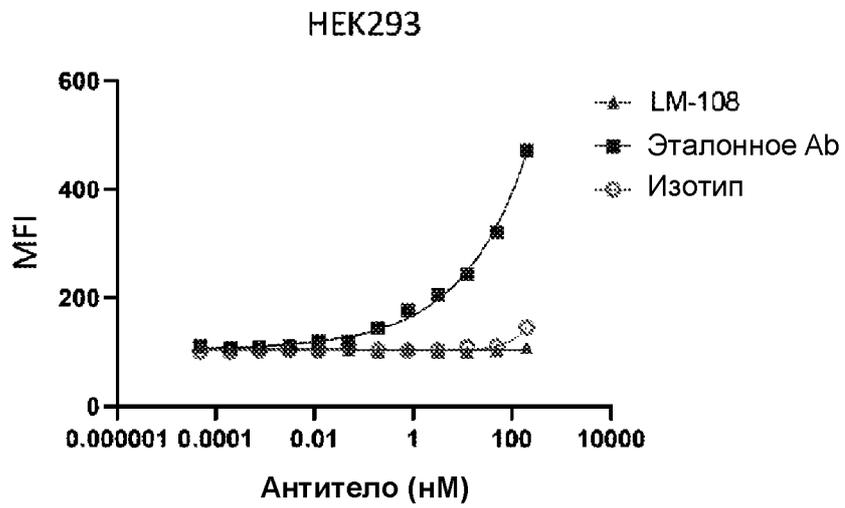
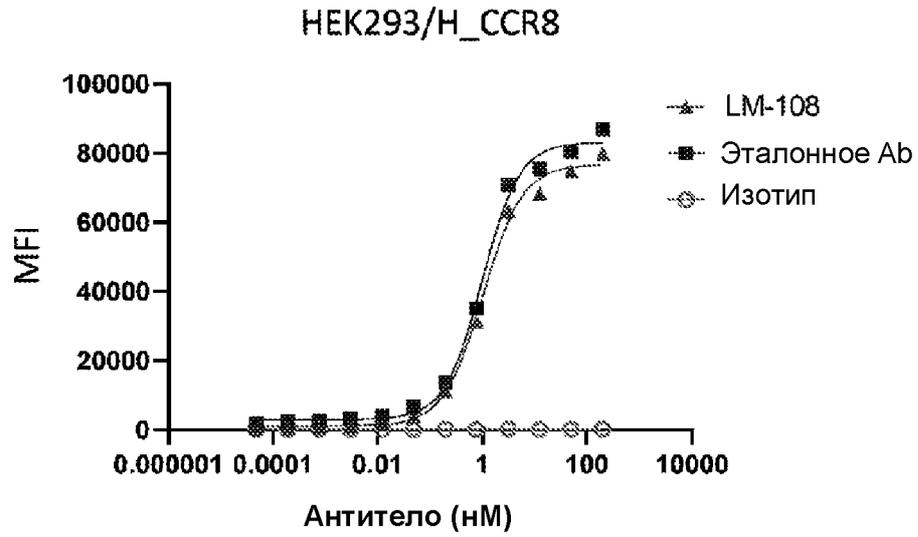
ФИГ. 3



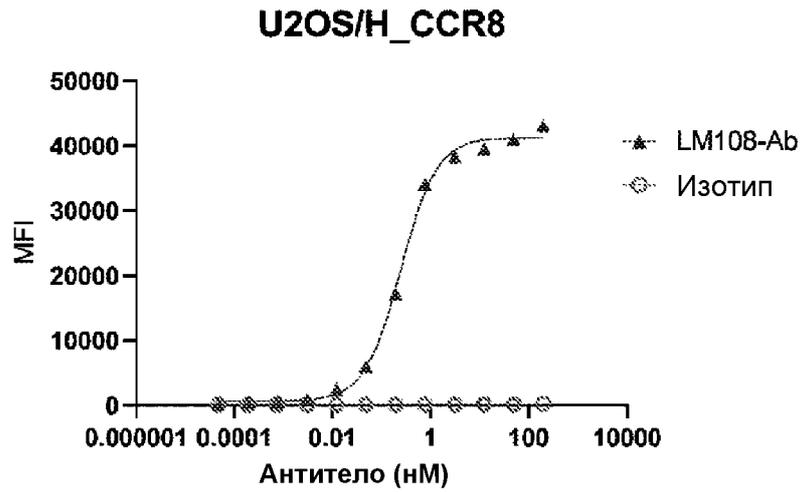
ФИГ. 4



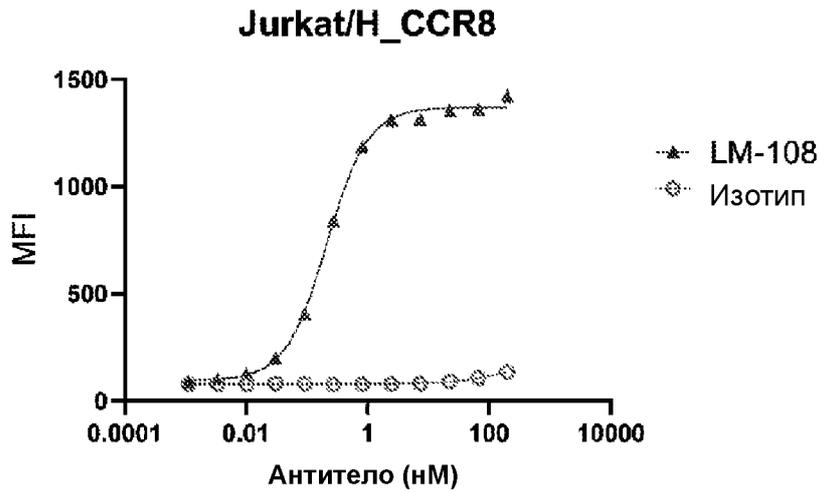
ФИГ. 5



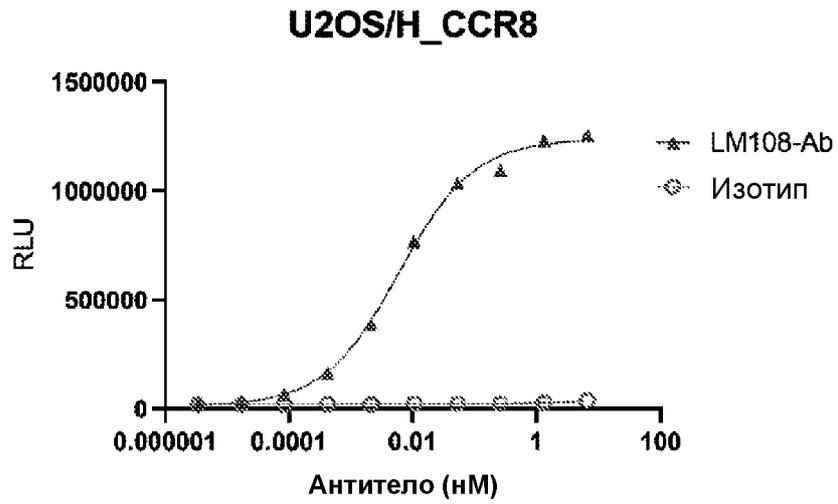
ФИГ. 6



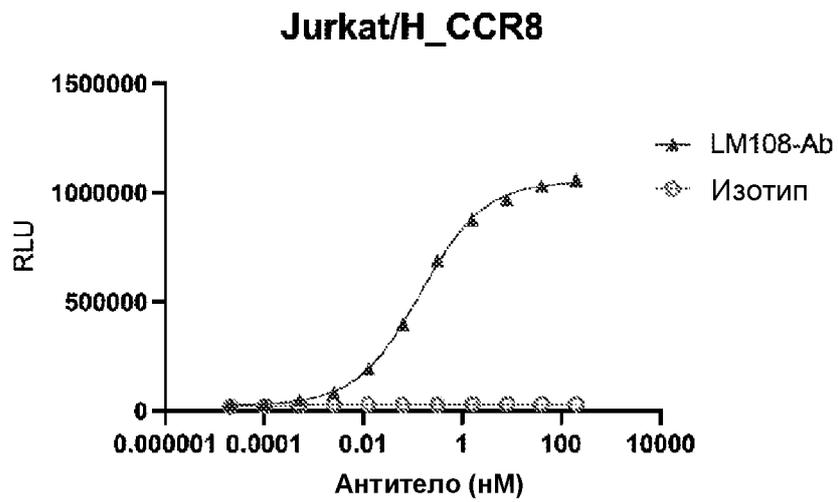
ФИГ. 7



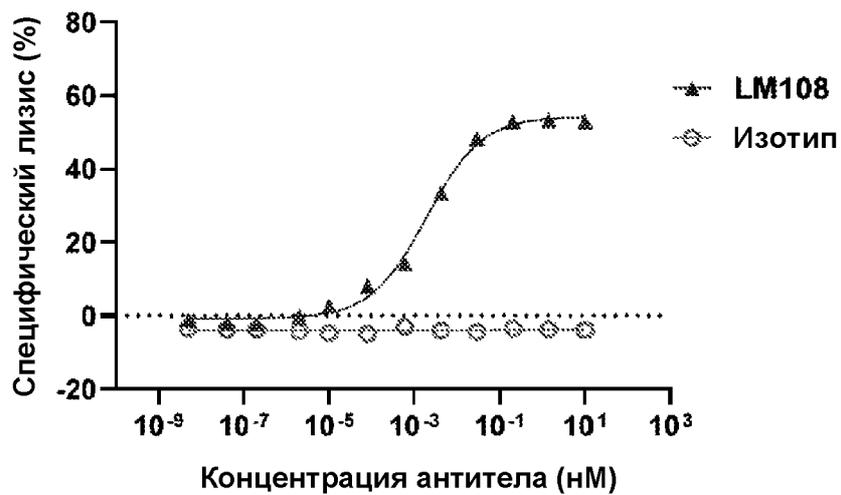
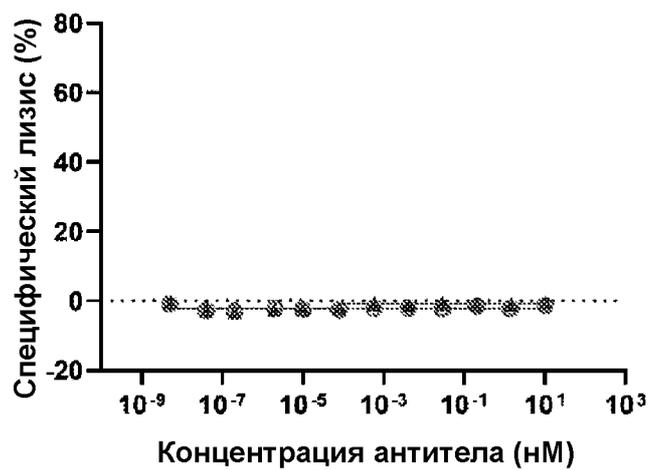
ФИГ. 8



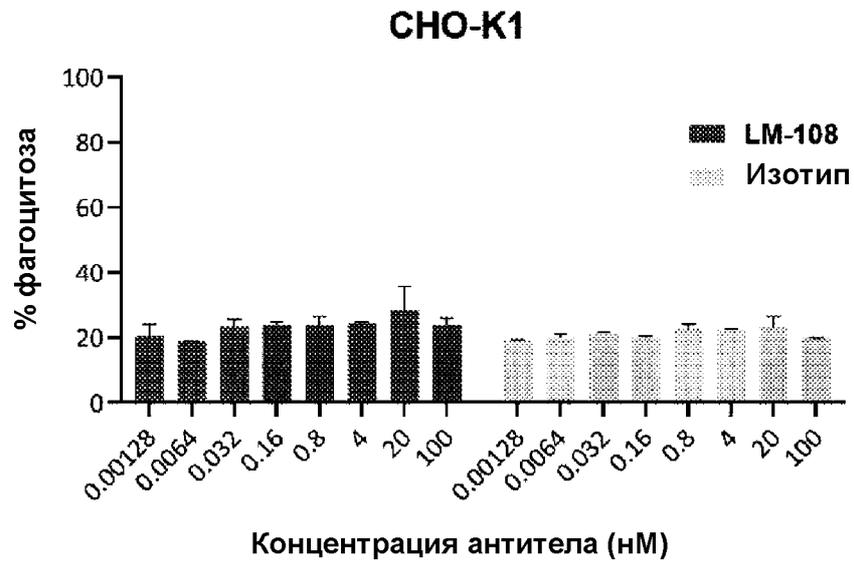
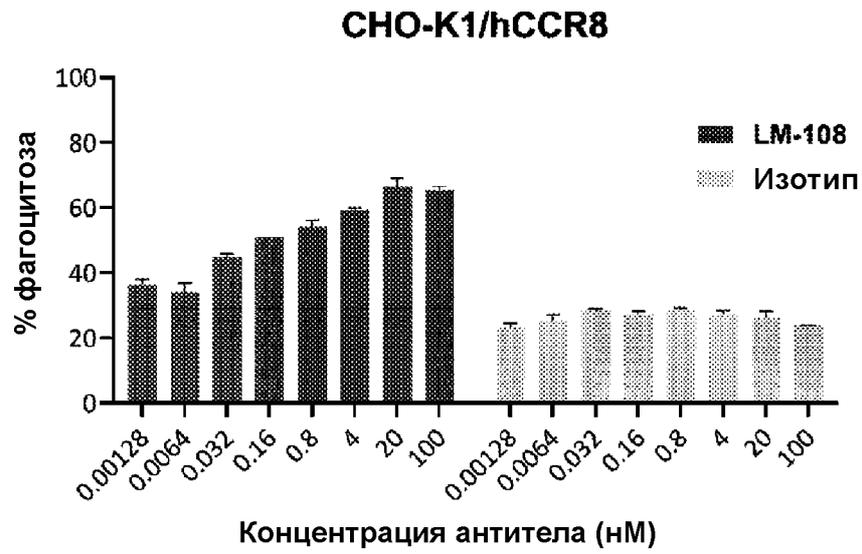
ФИГ. 9



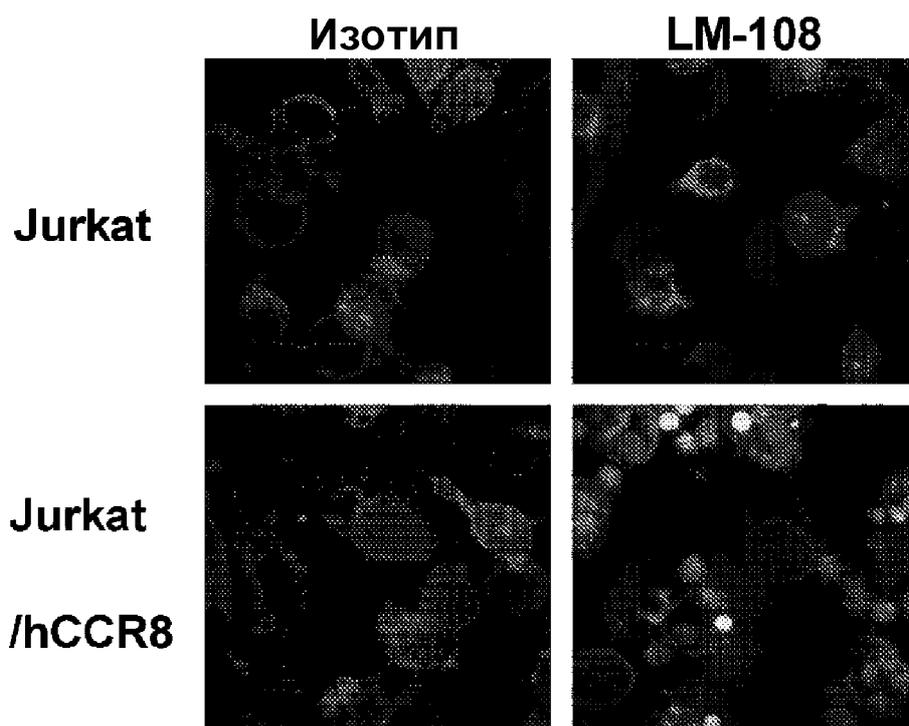
ФИГ. 10

HEK293/H_CCR8**HEK293**

ФИГ. 11



ФИГ. 12



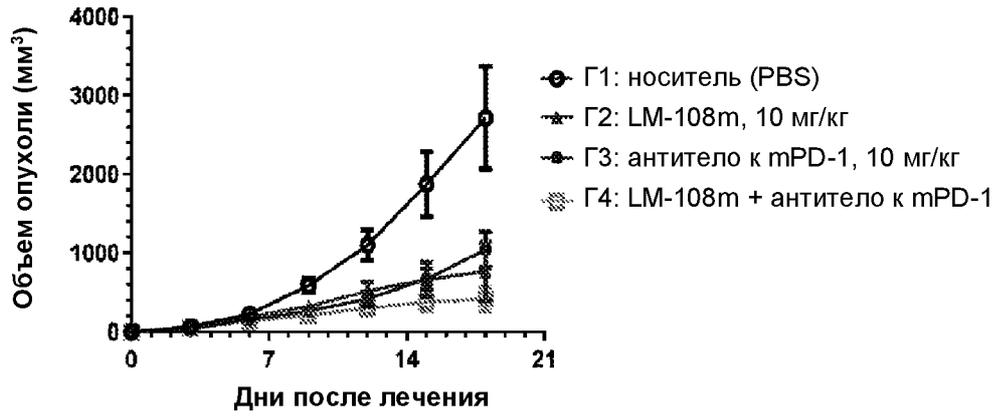
Красный: APC-конъюгированное антитело к CD14

Зеленый: окрашенная CFSE клетка-мишень

Оборудование: Operetta, 40x

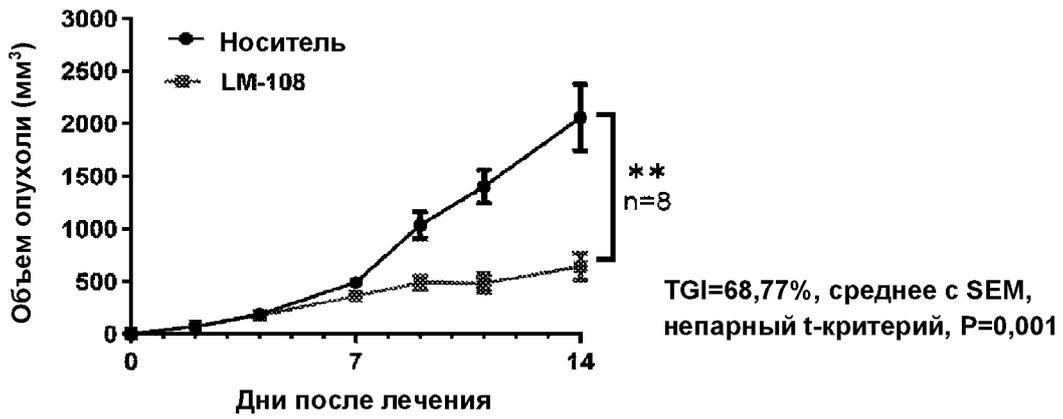
ФИГ. 13

СТ26



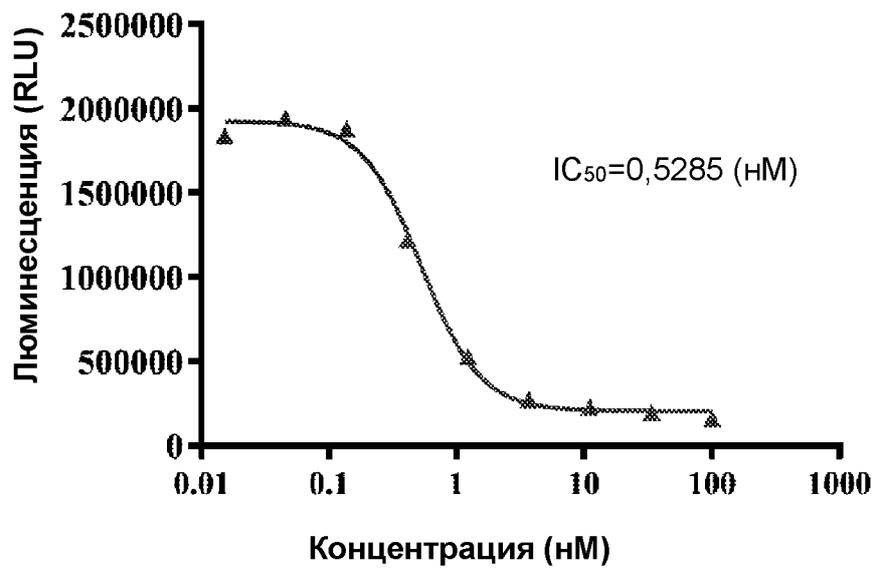
ФИГ. 14

МС38



ФИГ. 15

HEK293/H_CCR8



ФИГ. 16